

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIO

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



TESIS DOCTORAL

**Caracterización molecular de aislados de
Mycobacterium avium subespecie
paratuberculosis.
Mapa epidemiológico en España**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Castellanos Rizaldos

Directores:

**Alicia Aranaz Martín
Lucas Domínguez Rodríguez
Lucía de Juan Ferré**

Madrid, 2010



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
Y
CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)

Caracterización molecular de aislados de
***Mycobacterium avium* subespecie**
***paratuberculosis*.**
Mapa epidemiológico en España

Elena Castellanos Rizaldos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EUROPEO
POR LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

Facultad de Veterinaria
Departamento de Sanidad Animal
y
Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)

Dña. Alicia Aranaz Martín, Profesora contratada doctor, D. Lucas Domínguez Rodríguez, Catedrático y Dña. Lucía de Juan Ferré, Profesor Ayudante del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria.

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral **“Caracterización molecular de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. Mapa epidemiológico en España”** ha sido realizada por la licenciada en Veterinaria Dña. Elena Castellanos Rizaldos en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) bajo nuestra dirección y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al Título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Parte de esta tesis ha sido realizada en la Saint George's University de Londres, Reino Unido y la University of Calgary, Canadá. La financiación del trabajo se realizó mediante los proyectos AGL2005-07792 del Ministerio de Ciencia e Innovación, el proyecto europeo ParaTBTools FP6-2004-FOOD-3B-023106 y la beca de Formación de Profesorado Universitario (F. P. U.), AP2005-0696, otorgada por el Ministerio de Educación.

Dra. Alicia Aranaz Martín

Dr. Lucas Domínguez Rodríguez

Dra. Lucía de Juan Ferré

A mi madre, hermana y abuela Elena, a ellas les debo todo

A mi padre y abuela Isabel que siguen presentes cada día

A Devin, gracias por estar ahí

A mi familia

*Recuerda que cualquier
momento es bueno para
comenzar
y que ninguno es tan terrible
para claudicar.*

*No olvides
que la causa de tu presente
es tu pasado
así como la causa de tu
futuro será
tu presente.*

*Aprende de los audaces,
de los fuertes,
de quién no acepta
situaciones,
de quién vivirá a pesar de
todo,*

*piensa menos en tus
problemas
y más en tu trabajo
y tus problemas sin
alimentarlos morirán.*

*Aprende a nacer desde el
dolor*

*y a ser más grande que el
más grande de los
obstáculos.*

Pablo Neruda

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría hacer mención a la labor desarrollada por mis directores de tesis y otros profesores que forman parte del centro VISAVET, ya que sin ellos ésta no hubiera sido posible. A los profesores Dr. Lucas Domínguez y Dra. Ana Mateos por haber apostado en mí desde el principio. A la Dra. Lucía de Juan por haberme iniciado en este apasionante mundo de las micobacterias y en especial el de la paratuberculosis, gracias también por tu paciencia en la corrección de esta tesis. Por último, mi más sincero y especial agradecimiento a la Dra. Alicia Aranaz, en sí esta tesis es en parte fruto de su paciencia, dedicación, esfuerzo, ayuda y confianza. Sin duda, nunca sabré como agradecerte todo lo que has hecho por mí. ¡Gracias!

En segundo lugar, expresar mi gratitud a todas las personas de otras instituciones que a lo largo de estos años han contribuido también a este trabajo.

Por un lado, a uno de mis tutores externos, el Dr. Tim Bull, el cual me acogió como uno más de su grupo y con el cual he aprendido algo todos y cada uno de los días que he compartido con él. Gracias por enseñarme tanto y haberme brindado esa oportunidad. También a Richard, mi compañero australiano, sin él todo ese tiempo en Londres no hubiera sido lo mismo y del cual no he dejado de aprender a la vez que no paraba de reír. Dentro de este laboratorio también me gustaría expresar mi gratitud a todo el grupo Bug@s de la Universidad de Saint George's y en especial a Jason Hinds, sin los cuales parte de lo recogido en esta tesis no habría sido posible.

Por otro, mis más sinceros agradecimientos a mi otro tutor externo, el Dr. Jeroen De Buck, a pesar de su juventud destaca por ser un gran líder de grupo al que todo el mundo aprecia y respeta. Gracias por haberme dejado integrarme dentro de un grupo en el que se respira uno de los ambientes de trabajo más agradables y distendidos que he encontrado. Gracias a Karen y a Hermon, también profesores miembros del grupo. Mi más sincera gratitud por vuestra amabilidad, por valorarme y haberme tendido vuestra mano.

Por último, me gustaría agradecer a la gente de otras instituciones (Javier Millán, a Nieves Negré, a Lluís Parpal y a Karen Stevenson) por la oportunidad brindada en su día para establecer una colaboración, fruto de la cual han surgido algunos de los trabajos incluidos en esta tesis.

A continuación, mis más sinceras gracias a toda la plantilla de VISAVET, configurada por un sinfín de gente muy especial, que son responsables de este buen ambiente de trabajo y cuyos ánimos y ayuda siempre que la he necesitado han resultado en esta tesis. Sin embargo, me gustaría hacer especial mención al Servicio de Informática y Comunicación (Carlos y Sergio), especialmente a Carlos, sin él el formato de esta tesis no sería lo que es.

Dentro de VISAVET al grupo de micobacterias, a todas las personas que forman parte ahora o han formado parte de él a lo largo de estos años (Cristina Lozano, Nuria Álvarez, Ángel, Andrés, Fernando, Julio, Javi, Fran, Bea, Tati, Sabrina, Nuria Moya, Alex, Cris, Laura, Carmen, Leo, Johanna, Lucía, Alicia, Ana y Lucas) y con los cuales he pasado ratos muy divertidos (que son los que quiero que perduren en mi memoria). El grupo es lo que es gracias al granito de arena aportado por todos y cada uno de ellos. El haber trabajado durante todo este tiempo a vuestro lado ha sido todo un orgullo y una satisfacción.

Me gustaría expresar mis agradecimientos más especiales a Sabrina y a Nuria, con las que empecé hace ya unos cuantos años y que antes que compañeras son amigas, confidentes... sin ellas el día a día no hubiera sido lo mismo. Gracias por escucharme, por vuestra ayuda, paciencia y sobretodo, vuestros buenos consejos. ¡Os voy a echar infinitamente de menos! También a Mauri, gracias por toda tu sabiduría y consejos acertados, por haber compartido este tortuoso camino de la tesis y haberme dado siempre el prisma más “maduro” de las cosas.

También a mis amigos de la facultad (Mari Carmen, Anahí, Inés, Cris, Debo, Lauri, Isa, Mary, Ana, Mercedes, Juan, Alberto y Miguel), con los que he atravesado el duro y largo camino de la carrera, camino que llega hasta el día de hoy. Gracias por estar ahí siempre que os he necesitado y por haberme desprendido una sonrisa hasta en los momentos más duros. Espero que sigamos en el mismo camino que nos unió al empezar la carrera durante muchos años. También gracias a dos amigas especiales de la etapa universitaria, compañeras y amigas de colegio mayor, Leti y Bego. Gracias Bego por todos los buenos ratos que hemos pasado, y aunque ahora nos separe la distancia te tengo igualmente presente. Gracias por compartir estos años conmigo y por seguir ahí. Y a Leti, una de las personas con mejor corazón que he conocido, una persona muy especial. Sigue así y mucho ánimo que a base de esfuerzo estás consiguiendo todo lo que te propones y lo seguirás haciendo.

Especialmente gracias también a mis amigos de Cuenca, a los que puedo decir con orgullo que llevo unida muchos años, con algunos desde el jardín de infancia. Gracias por haberme hecho pasar todos esos buenos e irrepetibles momentos, por acompañarme en el recorrido de muchas etapas, y por seguir ahí en las que aún nos quedan por recorrer. Gracias

a Dani, Raquel, Nieves, Vicente, Silvia G, Ricardo, Silvia B, Iván, Fran, Gonzalo, Jose Luis y Arturo.

Gracias también a la gente tan maravillosa que he ido encontrando en mi camino durante mis aventuras en el extranjero y a las cuales no olvido, a Noe, Rosana y Eunyoung. A toda la gente que he conocido en esta última etapa de la tesis, por haberme hecho pasar ratos inolvidables e increíbles que perdurarán para siempre en mi memoria. Gracias a la gente de Londres Cris, Lídice, Barry, Mary, Andrea, Silvia, María y Stuart. Gracias también a la gente de mi última aventura canadiense, que además de compañeros de laboratorio eran amigos y con los que hice excursiones y visto sitios espectaculares que se mantendrán grabados en mi retina. Con los que también me he reído mucho, he compartido consejos y ratos inolvidables. Gracias a Rienske, Erin, Jenneke, Wilko, Nick (¡gracias de nuevo por tu gran ayuda en las correcciones de inglés de esta tesis y de alguno de los artículos!), Praceda, Amanda, Michelle, Clarisse, Mathieu y Fey.

Por otro lado, me gustaría que quede aquí reflejado mi más sincera gratitud a todos los amigos de mis padres. Aunque de una manera especial a Pepe, a Paloma y a Jesús, por hacer tan feliz a mi padre y por haberle enseñado el significado de incondicionalidad, fraternidad, amor y amistad. Gracias por ser tan especiales y por seguir ahí compartiendo vuestras vidas con nosotras y sobre todo por hacer sentir cada día a mi madre una persona especial. Gracias, no sé si algún día podré llegaros a pagar todo lo que habéis hecho por nosotras.

A Devin, mi “guiri” particular, por ser así y hacer que cada día sea más especial que el anterior, por haberme sabido sacar una sonrisa hasta en los momentos más tristes, por su paciencia, comprensión, entendimiento y entrega. Espero que este viaje en el que nos hemos embarcado hace casi cuatro años siga por muchos, muchos años. Te quiero y no quiero que te vayas de mi lado. Además, infinitas gracias por corregirme todo el inglés que aparece en esta tesis, ¡sin ti ésta tampoco hubiera sido posible!

Gracias a mi familia, a mis tíos Maribel y Jose Luis, Maria Antonia y tío Jesús (aunque no haya podido esperar a esta tesis), tíos Héctor y Laura, tía Pili y a mis primos Josechu, María, Jorge y Piti, por haber sabido estar ahí siempre apoyándome a lo largo de esta dura etapa de los últimos años y por todo vuestro cariño. Os quiero.

A mi abuela Isabel, que no ha llegado a ver este trabajo pero espero que lo esté disfrutando y se sienta tan orgullosa de su nieta como siempre lo ha hecho. Ojalá hoy pudieras ver el fruto de todo el esfuerzo del que has sido partícipe a lo largo de toda mi vida. Va por ti, allá donde estés. Siempre te querré.

A mi abuela Elena, que aparte de abuela ha sido madre, tutora, cuidadora y muchas más cosas que además de difíciles de plasmar en un papel tampoco tendría el espacio suficiente para ello. Gracias por enseñarme que con trabajo y fuerza de voluntad puedes conseguir muchas de las cosas que uno se propone. Gracias por seguir ahí, eres una persona muy especial. Te quiero. Y, aunque parezca banal no puedo dejar de poner unas palabras para Junqui, ya que pienso en mi abuela y es imposible no asociarla a ella. Gracias por estos 13 años tan llenos de cariño y compañía que nos distes.

A mi hermana Carla, ¡qué puedo decir de ella! Ha demostrado ser la mejor hija, hermana, nieta,...Ha sido capaz de superar todas las adversidades, haciéndose más fuerte, es una superviviente nata. Como siempre dice mi madre “*Dios escribe derecho pero con los renglones torcidos*”, y entre estos renglones ella ha sido capaz de llegar a donde siempre se ha propuesto. Te quiero mucho. Gracias también a Óscar, por estar ahí y por hacer feliz a alguien que es tan importante para mí.

A mi madre, a la que dedico especialmente esta tesis. Todo lo que soy os lo debo a papá y a ti. Gracias por tus consejos, paciencia, entrega, lucha, fuerza de voluntad y sobretodo el amor que nos has demostrado durante todos estos años. Gracias por ser tan buena madre y por luchar por lo que te mereces. No tengo palabras para expresar todo lo que siento por ti. Te quiero demasiado.

Por último a mi padre, al cual le dedico también especialmente esta tesis. Aunque no estés hoy aquí entre nosotros, sé que de alguna manera una parte de ti sí lo está. Gracias por ser como has sido y por habernos querido tanto, por haber demostrado esa fuerza, capacidad de sacrificio y de lucha. Como diría el propio Paul McCartney, al que tanto idolatraste “*El que no se rinde es todo un valiente*” y si hay alguien que cumpla esa máxima eres tú. No puedo dejar de olvidarte y quererte más cada día que pasa. Espérame con tu paciencia característica hasta el día que nos podamos volver a reunir. Hasta pronto.

Quisiera expresar de nuevo las gracias a todas las personas que he reflejado aquí y a todas las que haya podido olvidar sin mala intención. Habéis sido muy especiales a lo largo de este camino y todos y cada uno de vosotros habéis hecho posible el desarrollo de esta tesis.



Índice/ Table of contents

Capítulo I	Introducción	3
Chapter I		
	1. Género <i>Mycobacterium</i> y envoltura celular	5
	2. Complejo <i>Mycobacterium avium</i> (MAC)	12
	3. <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	15
	4. Factores de virulencia en <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	18
	4.1. Genes de entrada a células mamíferas	18
	4.2. Proteínas PE y PPE	19
	4.3. Otros factores de virulencia	20
	5. Secuencias específicas de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	21
	6. Elementos repetitivos	23
	6.1. Secuencias de inserción	23
	6.2. Repeticiones de secuencia corta	29
	6.3. Repeticiones en tándem de número variable	31
	6.4. Unidades repetitivas intergénicas dispersas de micobacterias	35
	7. Técnicas de caracterización molecular en <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	39
	7.1. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción	39

7.2. Electroforesis en campo pulsado	45
7.3. Análisis de las diferencias representacionales	48
7.4. Análisis de polimorfismos de fragmentos largos amplificados	49
7.5. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante	50
7.6. Tipificación molecular mediante el análisis de polimorfismos de nucleótido único	51
7.7. Análisis de curvas de disociación de alta resolución	53
7.8. Hibridación genómica comparada por microarray	55
7.9. Fragmentos polimórficos largos	57
8. La enfermedad de Johne o paratuberculosis	59
8.1. Signos clínicos y progresión de la enfermedad en ganado vacuno	60
8.2. Signos clínicos y progresión de la enfermedad en otros animales	62
8.3. Prevalencia de la enfermedad en Europa	62
9. Diagnóstico de la enfermedad de Johne	64
9.1. Detección directa de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	64
9.2. Detección de la respuesta inmune del hospedador	68
9.2.1. Pruebas serológicas	68
9.2.2. Ensayo de la respuesta inmune mediada por células	69
10. Análisis histopatológico de la enfermedad de Johne	70
11. Profilaxis, terapia y control de la enfermedad de Johne	74
11.1. Vacunación en animales	74
11.2. Tratamiento de la enfermedad	77
11.3. Estrategias de control	78
12. <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> y la enfermedad de Crohn	79

	Objetivos Objetives	93
Capítulo II	Descripción de polimorfismos de nucleótido único específicos de cada tipo de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> (I, II y III)	95
Chapter II	Description of single nucleotide polymorphisms, specific for each type of <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> (I, II and III)	
Capítulo III	Caracterización molecular de aislados de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> tipo II y III mediante una combinación de loci MIRU-VNTR	115
Chapter III	Molecular characterization of <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> types I and III by a combination of MIRU-VNTR loci	
Capítulo IV	Identificación rápida de los miembros del complejo <i>Mycobacterium avium</i> mediante PCR en tiempo real y análisis de curvas de fusión de alta resolución	139
Chapter IV	Rapid identification of members of the <i>Mycobacterium avium</i> complex by real time PCR and high resolution melt analysis	
Capítulo V	Descripción de diferencias estables y variables en el genoma de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> mediante análisis por microarray	163
Chapter V	Description of stable and variable differences in the genome of <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> by microarray analysis	
Capítulo VI	Discusión	221
Chapter VI	Discussion	
	Conclusiones	241
	Conclusions	
	Resumen	251
	Summary	
	Resumen de otras publicaciones derivadas de la tesis	263
	Summary of other publications derived from the thesis	
	Referencias bibliográficas	293
	Reference list	

Anexo	Lista de especies de micobacterias descritas	337
Appendix	List of described mycobacteria	
	Lista de abreviaturas	340
	List of abbreviations	
	Lista de figuras	343
	List of figures	
	Lista de tablas	347
	List of tables	
	Lista de publicaciones	349
	List of publications	
	Secuencias publicadas en el GenBank	351
	Sequences published in GenBank	
	Autorizaciones de los co-autores de los artículos	361
	Co-authors permissions	

Capítulo I/Chapter I

Introducción

Introduction



“La recompensa de un trabajo bien hecho es la oportunidad para hacer más”

“The reward for work well done is the opportunity to do more”

Jonas Salk, inventor de la vacuna contra la poliomielitis

1. Género *Mycobacterium* y envoltura celular

En la actualidad hay descritas 147 especies dentro del género *Mycobacterium*, las cuales se recogen en la lista de nombres procariotas con base en la nomenclatura (*List of prokaryotic names with standing in nomenclature*) de J. P. Euzéby's (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>) (Anexo).

La primera identificación de una micobacteria data de finales del siglo XIX, momento en el que se describió el bacilo tuberculoso (denominado *Bacterium tuberculosis* por Koch en 1882) y el bacilo de la lepra (denominado *Bacillus leprae* por Hansen en 1880). Sin embargo, la clasificación de ambas especies como micobacterias no tuvo lugar hasta 1896, año en el cual Lehmann y Neumann propusieron que ambas se incluyeran dentro del género *Mycobacterium* y a las cuales ellos renombrarían *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* (Lehman y Neumann, 1896).

Posteriormente, el género *Mycobacterium* se clasificó dentro de la familia *Mycobacteriaceae*, orden *Actinomycetales*, clase *Actinomycetes* (Shinnick y Good, 1994). Esta división inicial estaba basada en dos características presentes en todos y cada uno de los miembros del género: la morfología (bacilos, inmóviles) y la ácido-alcohol resistencia (Lehmann y Neumann, 1896).

A continuación se describieron criterios adicionales para la diferenciación de los miembros del género *Mycobacterium* como la Gram positividad, la tasa de crecimiento, la resistencia a la penicilina, el porcentaje de guanidina y citosina (GC), el perfil de ácidos micólicos y la producción de arilsulfatasas (Wayne y Díaz, 1986).

En la actualidad, los requisitos mínimos necesarios para la inclusión de una especie dentro del género *Mycobacterium* son la ácido-alcohol resistencia, la presencia de ácidos micólicos con 60-90 átomos de carbono de longitud y un 61-71% de GC en su genoma (Levy-Frebault y Portaels, 1992).

Las especies pertenecientes al género *Mycobacterium* también se clasifican en función de otras características como el tiempo requerido para la formación de colonias visibles en medio sólido. Así, los miembros del género se clasifican comúnmente en dos grandes grupos: micobacterias de “crecimiento rápido” y de “crecimiento lento”. En el caso de la primeras, la aparición de colonias visibles se produce en un período inferior a siete días y en el caso de las segundas mayor a siete días.

A su vez, la especies de “crecimiento lento” se han subdividido en tres grupos diferentes en base la producción de pigmentación visible (Timpe y Runyon, 1954): fotocromógenas (Grupo I de Runyon), escotocromógenas (Grupo II de Runyon) y no-fotocromógenas (Grupo III de Runyon).

Esta clasificación no tiene validez taxonómica pero sí clínica, ya que las especies de crecimiento lento son generalmente patógenas para los animales y el hombre (Tabla 1).

Tabla 1. Principales grupos de micobacterias agrupadas según el criterio de la producción de pigmento (Runyon y col. 1959).

Grupo	Velocidad de crecimiento	Especies de micobacterias
Grupo I de Runyon fotocromógenas (pigmento amarillo con luz)	Crecimiento lento (> 7 días)	<i>Mycobacterium asiaticum</i> , <i>Mycobacterium kansasii</i> , <i>Mycobacterium marinum</i> , <i>Mycobacterium simiae</i>
Grupo II de Runyon escotocromógenas (pigmento amarillo naranja)		<i>Mycobacterium flavescens</i> , <i>Mycobacterium gordonae</i> , <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , <i>Mycobacterium szulgai</i>
Grupo III de Runyon no cromógenas (no producen pigmento)		<i>Mycobacterium avium</i> , <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> , <i>Mycobacterium gastri</i> , <i>Mycobacterium</i> <i>haemophilum</i> , <i>Mycobacterium intracellulare</i> , <i>Mycobacterium</i> <i>malmoense</i> , <i>Mycobacterium terrae</i> , <i>Mycobacterium triviale</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium ulcerans</i> , <i>Mycobacterium xenopi</i>
Grupo IV de Runyon no cromógenas (no producen pigmento)	Crecimiento rápido (<7 días)	<i>Mycobacterium abscessus</i> , <i>Mycobacterium chelonae</i> , <i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>Mycobacterium goodii</i> , <i>Mycobacterium immunogenum</i> , <i>Mycobacterium mucogenicum</i> , <i>Mycobacterium peregrinum</i> , <i>Mycobacterium senegalense</i> , <i>Mycobacterium septicum</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Mycobacterium wolinskyi</i>
No cultivable		<i>Mycobacterium leprae</i>

Por otro lado, los avances en el terreno de la biología molecular y de la genética bacteriana han permitido a su vez la clasificación taxonómica de las micobacterias en base a los polimorfismos presentes en las secuencias de diferentes genes que se emplean como diana.

Así, en la actualidad uno de los genes diana más comúnmente empleado es el gen del ARN ribosómico 16S (ARNr 16S), caracterizado por tener una longitud aproximada de 1500 nucleótidos y presentar en su secuencia regiones altamente conservadas y otras regiones más hipervariables en todas y cada una de las especies de micobacterias (Boddinghaus y col. 1990). Las dos regiones hipervariables del gen ARNr 16S son las denominadas regiones A y B. Para la identificación de las diferentes especies de micobacterias, la secuenciación de la región hipervariable A se considera normalmente suficiente, aunque adicionalmente se puede emplear los datos de la secuencia de la región B como confirmación.

Otra característica a destacar con respecto al gen ARNr 16S es la presencia de una única copia del mismo en aquellas micobacterias de crecimiento lento y dos en el caso de las de crecimiento rápido, con las excepciones de *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium chelonae*. En el caso particular de los miembros del género *Mycobacterium*, dado que éste comprende especies muy cercanas filogenéticamente, la secuencia del gen ARNr 16S normalmente difiere en tan sólo uno, dos o ningún nucleótido. Sin embargo, las mutaciones puntuales encontradas en las secuencias de las distintas especies de micobacterias constituyen datos suficientes para la realización de una clasificación taxonómica completa, tal como se refleja en las Figuras 1 y 2 (Tortoli, 2003).

Figura 1. Adaptación del árbol filogénico en el cual están representadas las micobacterias de crecimiento lento en función de los datos obtenidos tras la secuenciación del gen del ARNr 16S (Tortoli, 2003).

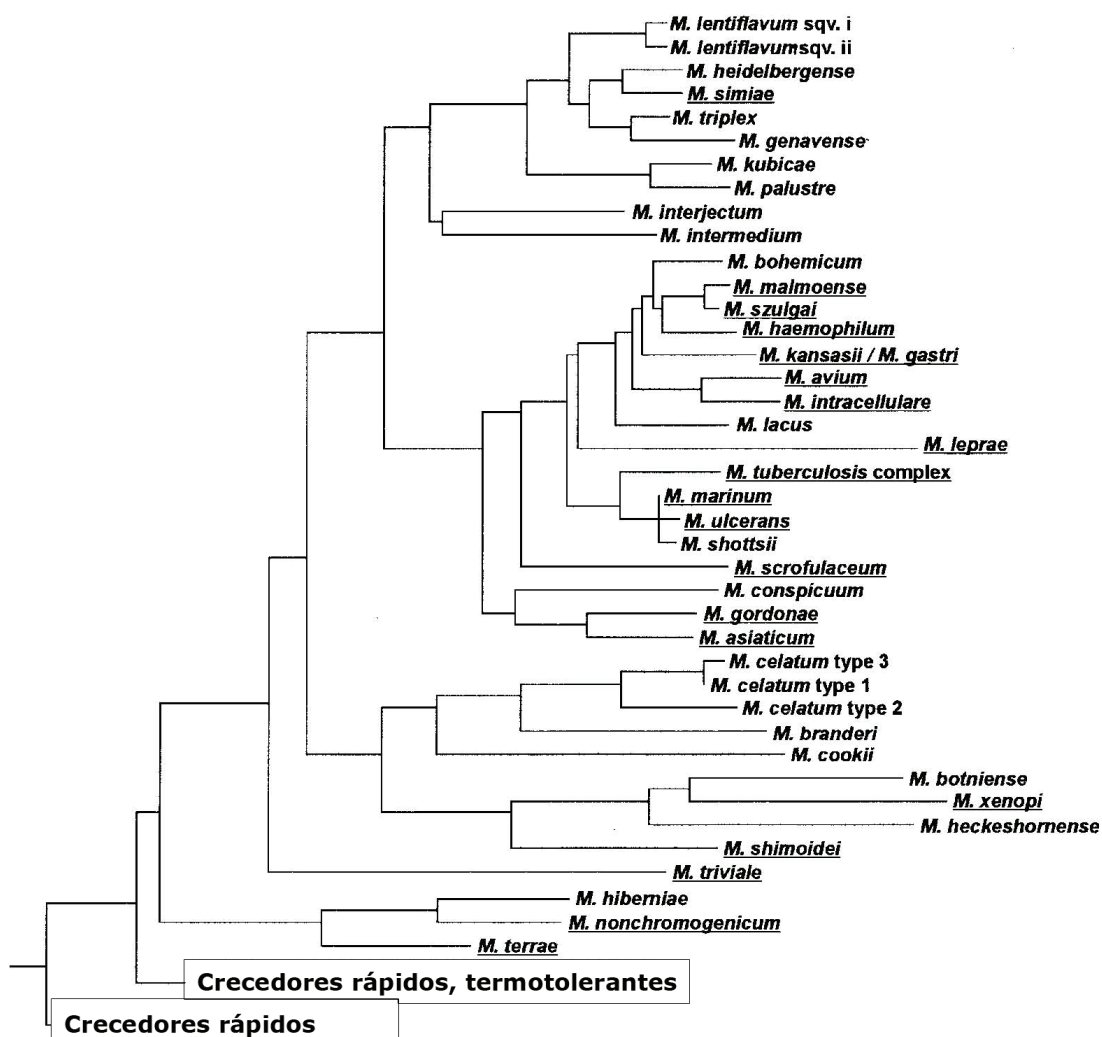
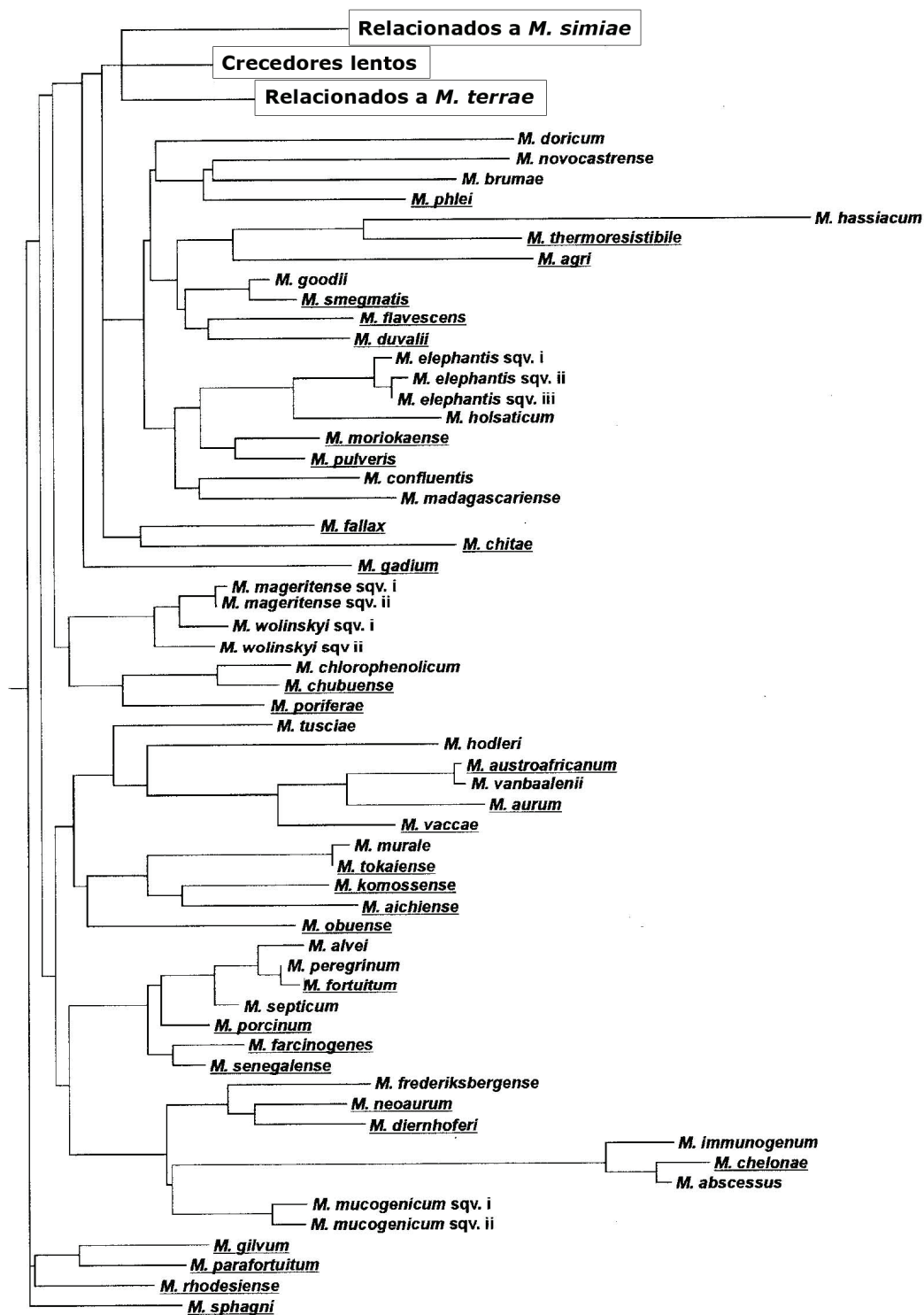


Figura 2. Adaptación del árbol filogenético de las especies de micobacterias clasificadas como de crecimiento rápido en base a la secuencia del ARNr 16S (Tortoli, 2003).



Otra de las dianas que ha sido ampliamente empleada en la clasificación taxonómica de las micobacterias es el *hsp65* (*heat shock protein*), gen que codifica la proteína de 65 kDa altamente conservada entre las diferentes especies de micobacterias y que presenta diversas regiones hipervariables, al igual que el gen ARNr 16S. Además existen otras regiones genómicas de interés taxonómico en micobacterias, como el gen superóxido dismutasa y la región comprendida entre el ARNr 16S y 23S, denominada ITS (*internal transcribed spacer*), entre otras (Tortoli, 2003).

- Envoltura celular

La pared celular de las micobacterias presenta como característica principal un alto porcentaje en lípidos con respecto a la masa celular total (40%), porcentaje muy elevado en comparación con el descrito en otras bacterias Gram positivas (5%) e incluso Gram negativas (10%) (Goren y Brenna, 1979). Esta propiedad podría explicar la tendencia de las micobacterias a producir un crecimiento en forma de agregados bacterianos y también la propiedad de ácido-alcohol resistencia (Daffé y Reyrat, 2008).

La pared celular de micobacterias está constituida por una capa interna y una capa externa que rodean a una membrana plasmática. El compartimento exterior o capa externa está formado a su vez por lípidos y proteínas. Estos lípidos están normalmente asociados a la pared celular a través de ácidos grasos de cadena corta y larga que complementan las cadenas largas y cortas de la capa interna.

Los lípidos y polisacáridos asociados con la parte externa de la pared celular externa son: el lipoarabinomanano (LAM), lipomanano, lípidos tiocerolos como el dimicocerosato, dimicolil-trealosa, sulfolípidos específicos en el caso de *M. tuberculosis* y el tidil-inositol-manósido (Hett y Rubin, 2008).

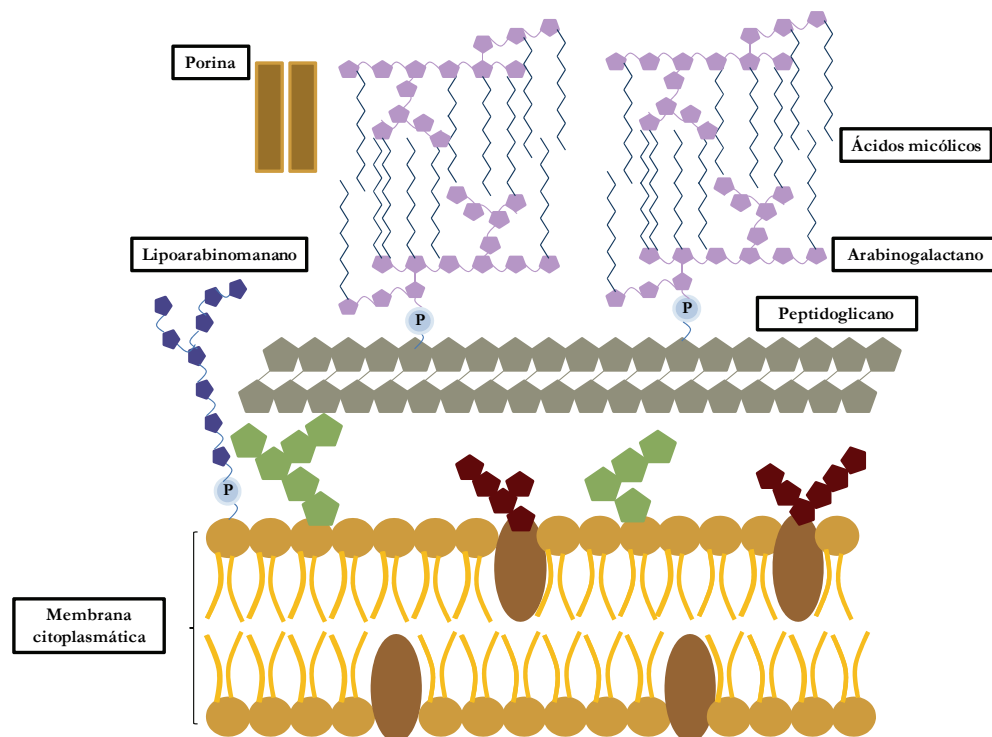
De éstos destaca el LAM, lipoglicano que presenta una estructura compleja de 17 kDa y que está a su vez formado por tres dominios; un núcleo polisacárido constituido por unidades de D-manana y D-arabinana, un dominio formado por fosfatidilinositol anclado a la membrana y un polisacárido terminal que contiene el disacárido β -D-Araf (1-2)- α -D-Araf. Las especies de micobacterias patógenas y de crecimiento lento (como es el caso de *M. leprae* y *M. tuberculosis*) presentan en el extremo terminal β -Ara un residuo de manosa, referido como ManLAM, mientras que las especies de crecimiento rápido (como *M. fortuitum* y *M.*

smegmatis) presentan un fosfoinositol, conocido como PILAM (Chatterjee y col. 1992; Prinzi y col. 1993; Nigou y col. 2003).

Todas estas proteínas y lípidos externos constituyen los componentes solubles de la pared celular y presentan una función esencial durante el proceso de interacción de las micobacterias y el sistema inmune del hospedador (Brennan, 2003).

El compartimento interno está constituido por peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos (AM), los cuales están unidos covalentemente y constituyen el denominado complejo PG-AG-AM. Este complejo es insoluble y se caracteriza por conformar la estructura esencial de la pared celular y además es la diana a la que van dirigidas la mayoría de los agentes antimicrobianos (Hett y Rubin, 2008) (Figura 3).

Figura 3. Representación esquemática de la pared celular en micobacterias en la cual se observa el complejo formado por peptidoglicano-arabinogalactano-ácidos micólicos.



El PG o mureína constituye un material rígido, el cual facilita a la bacteria el mantenimiento de su forma y la protege de la presión osmótica, aunque a su vez les permite crecer y expandirse. Está compuesto por cadenas de péptidos y glicanos, éstos últimos representados por cadenas largas formadas por repeticiones seriadas de N-acetilglucosamida y N-acetil murámico (Hett y Rubin, 2008).

El AG es el principal polisacárido de la pared micobacteriana, con una función importante en el mantenimiento de la arquitectura celular y en el anclaje de la capa impermeable de AM a la capa de PG. AG está compuesto por arabinano y galactano y está unido covalentemente a su vez a la capa de PG mediante una unión fosforil-N-acetilglucosaminosil-ramnosil (McNeil y col. 1990; Crick y col. 2001). Este tipo de unión está relacionada con el empleado para la adhesión del ácido teicoico a la capa de PG en las bacterias Gram negativas (Kojima y col. 1985). En lo que respecta a los AM, éstos son los determinantes principales de la permeabilidad de la pared celular y están constituidos por una variedad de ácidos grasos de cadena corta (60-90 carbonos/cadena) α -alkil y β -hidroxil.

Todas estas características de la pared celular bacteriana son distintivas y únicas de las micobacterias con respecto a la pared celular del resto de las bacterias. Sin embargo, aunque las micobacterias poseen una capa gruesa de PG y carecen de una membrana externa al igual que las bacterias Gram positivas, presentan también propiedades similares a las bacterias Gram negativas. Entre estas destaca la no retención de la tinción de Gram (sin embargo retienen la carbolfucsina aún en presencia de ácido y alcohol), debido a la presencia de porinas en la membrana lipídica externa, además de presentar un espacio en el mismo que podría funcionar de manera semejante al periplasma en las bacterias Gram negativas (Hett y Rubin, 2008).

2. Complejo *Mycobacterium avium* (MAC)

El complejo *Mycobacterium avium* (MAC) está constituido principalmente por un grupo de micobacterias medioambientales relacionadas entre sí y en el cual se incluyen *Mycobacterium avium* subespecie *avium* (*M. a. avium*), *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*M. a. paratuberculosis*), *Mycobacterium avium* subespecie *hominissuis* (*M. a. hominissuis*), *Mycobacterium avium* subespecie *silvaticum* (*M. a. silvaticum*) y *Mycobacterium intracellulare* (*M. intracellulare*) (Inderlied y col. 1993). Algunos autores incluyen otras especies como *Mycobacterium scrofulaceum* (Inderlied y col. 1993), aunque actualmente esta especie ha sido descartada como miembro de MAC por carecer de relación con *M. avium* o *M. intracellulare*. Ya durante esta última década se han descrito nuevos miembros de MAC como *Mycobacterium chimaera* (Tortoli y col. 2004), *Mycobacterium colombiense* (Murcia y col. 2006), *Mycobacterium*

arosiense (Bang y col. 2008), *Mycobacterium bouchedurbonense*, *Mycobacterium marseillense*, *Mycobacterium timonense* (Ben Salah y col. 2009).

Los miembros de este complejo MAC presentan unas características tanto genéticas como fenotípicas particulares, las cuales les permiten el crecimiento en biotipos naturales sin perder por ello su potencial patógeno. Entre estas características destacan el amplio rango de temperaturas dentro del cual son capaces de crecer (desde 20°C hasta 37°C), la capacidad de adaptación a nuevos sustratos con amplios rangos de pH, desde 4 a 7,5 [estando el pH óptimo comprendido entre 5,4 y 6,5 (Portaels y Pattyn, 1982)]. A su vez, todos los miembros de MAC destacan por ser ácido-alcohol resistente, presentar un crecimiento lento y producir un pigmento amarillo en ausencia de luz (Inderlied y col. 1993).

Los miembros de MAC se han clasificado en 28 serovares en función de la seroaglutinación descrita inicialmente por Schaefer y colaboradores (Schaefer, 1965; Inderlied y col. 1993) y el grado de virulencia de estos serovares fue determinado mediante la inoculación de estos serovares en pollos. Así, se clasificaron los serovares en patógenos para aves aquellos pertenecientes a *M. avium*, no patógenos los pertenecientes a *M. intracellulare* y el grupo intermedio, serovares que producían lesiones en el punto de inoculación.

De esta manera se han identificado los serovares 1-6, 8-11, 21 y 28 como pertenecientes a *M. avium*, virulentos para pollos, los serovares 7, 12-20, 23 y 25 como *M. intracellulare*, no virulentos en pollos y la especie dominante de los serovares restantes (21, 24, 26 y 28) no ha podido ser determinada (Saito y col. 1990; Wayne y col. 1993).

A su vez, los miembros de MAC han sido aislados fuera de hospedadores, en el medioambiente y en una amplia variedad de biotopos, entre los que se incluyen el suelo, tanques de almacenaje de agua, agua de desecho, agua municipal, aerosoles, protozoos, etc. (Tabla 2) (Biet y col. 2005).

Tabla 2. Principales fuentes de aislamiento ambientales de los distintos miembros de MAC descritas en la literatura (Biet y col. 2005).

Especie	Lugar de aislamiento	Referencia bibliográfica
MAC	Agua y suelo de ciénaga	(Kirschner y Bottger, 1992)
MAC	Fuente de agua residencial	(Von Reyn y col. 2002)
MAC	Sistema de recirculación de agua de un hospital	(Von Reyn y col. 1994; Tobin-D'Angelo y col. 2004; Álvarez y col. 2008)
MAC	Agua de piscinas municipales	(Havelaar y col. 1985; Leoni y col. 1999)
MAC	Fuentes de agua potable	(Aronson y col. 1999; Covert y col. 1999)
<i>M. a. avium</i>	Orden Díptera	(Fisher y col. 2001)
<i>M. a. avium</i>	<i>Blatta orientalis</i>	(Fisher y col. 2003)
<i>M. a. avium</i>	Gusanos de tierra	(Fisher y col. 2003)
<i>M. a. paratuberculosis</i>	Lodo líquido	(Larsen y col. 1956; Jorgensen y col. 1977)
<i>M. a. paratuberculosis</i>	Agua de río	(Jorgensen y col. 1977; Pickup y col. 2005; Pickup y col. 2006)
<i>M. a. paratuberculosis</i>	<i>Trichostrongylid larvae</i>	(Lloyd y col. 2001)
<i>M. a. paratuberculosis</i>	Orden Díptera	(Fischer y col. 2001)
<i>M. a. paratuberculosis</i>	<i>Nematode larvae</i>	(Whittington y col. 2001)
<i>M. a. paratuberculosis</i>	Gusanos de tierra	(Fisher y col. 2003)
<i>M. a. paratuberculosis</i>	<i>Blatta orientalis</i>	(Fischer y col. 2003)

Los miembros de MAC son capaces de causar infección en un amplio rango de animales domésticos, salvajes rumiantes y no rumiantes, los cuales podrían actuar como reservorio.

Así, *M. a. paratuberculosis*, patógeno obligado de animales (Merkal, 1984) se encuentra principalmente infectando a rumiantes domésticos (vacas, cabras y ovejas) pero también ha sido aislado de animales monogástricos (caballos, cerdos, pollos, primates, etc.) (Larsen y col. 1971; McClure y col. 1987). Aislados de *M. a. avium* y *M. a. silvaticum* son los causantes de la tuberculosis aviar (Matthews y McDiarmid. 1979; Ritacco y col. 1998) y *M. a. hominissuis* es patógeno de cerdos (Komijn y col. 1999). En el caso de rumiantes salvajes, las infecciones originadas por *M. a. avium* y *M. a. paratuberculosis* han sido documentadas en EEUU (Thorel y col. 1997; Amonsín y col. 2004; Motiwala y col. 2004), Europa (Windsor y col. 1984; Sigurdardottir y col. 1994; Thorel y col. 1997; Komijn y col. 1999), Australia (Feizabadi y col. 1996) y Nueva Zelanda (Collins y col. 1997). Con respecto al aislamiento de *M. a. paratuberculosis* en animales salvajes no rumiantes, éste ha sido descrito en diversos hospedadores como: armiño, comadreja, conejo, conejo salvaje, cuervo, grajilla, grajo, liebre, oso, rata, ratón, zorro, etc. (Beard y col. 2001; Kopečna y col. 2008; Stevenson y col. 2009).

Entre los miembros de este grupo MAC, destaca *M. a. hominissuis*, patógeno oportunista en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En el caso de los pacientes con SIDA, se ha descrito que la frecuencia de infecciones concomitantes por miembros de MAC oscila entre el 25 y el 50% (Horsburgh y col. 1991; Nightingale y col.

1992). Dentro de estas infecciones, entre el 87 y 98% de los casos *M. a. hominissuis* fue identificado como el agente causal principalmente implicado (Biet y col. 2005).

Estos datos ponen de manifiesto la importancia de la existencia de animales salvajes como posibles reservorios de micobacterias del complejo MAC, hechos que harían plausible la existencia de una posible transmisión bi-direccional entre los animales salvajes y el ganado. Con anterioridad esta probable ruta de infección fue demostrada experimentalmente (Mokresh y Butler, 1990), sin embargo aún se desconoce cual sería la principal vía de infección.

3. *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

Dentro de las especies del género *Mycobacterium* se encuadra *M. a. paratuberculosis*, miembro también del complejo MAC y agente etiológico de la enfermedad de Johne o paratuberculosis. La denominación actual de *M. a. paratuberculosis* (Thorel y col. 1990) es fruto de diferentes modificaciones desde su inicial descripción como *Darmituberculose* por Johne y Frothingham en 1895; *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johnei* por Twort e Ingram en 1912; *Bacterium paratuberculosis* por Bergey y colaboradores en 1923; *Bacillus paratuberculosis* por Krasilnikov en 1941 y más tardíamente *Mycobacterium johnei* por Francis y colaboradores en 1943.

M. a. paratuberculosis es un microorganismo ácido-alcohol resistente (lo cual se refleja en la presencia de una coloración roja en las tinciones de Zielh-Neelsen o Kinyoun), Gram positivo y su tamaño oscila entre 0,5 y 1,5 μm . Fenotípicamente se caracteriza por un crecimiento lento que requiere micobactina en el medio y formación de colonias rugosas no pigmentadas.

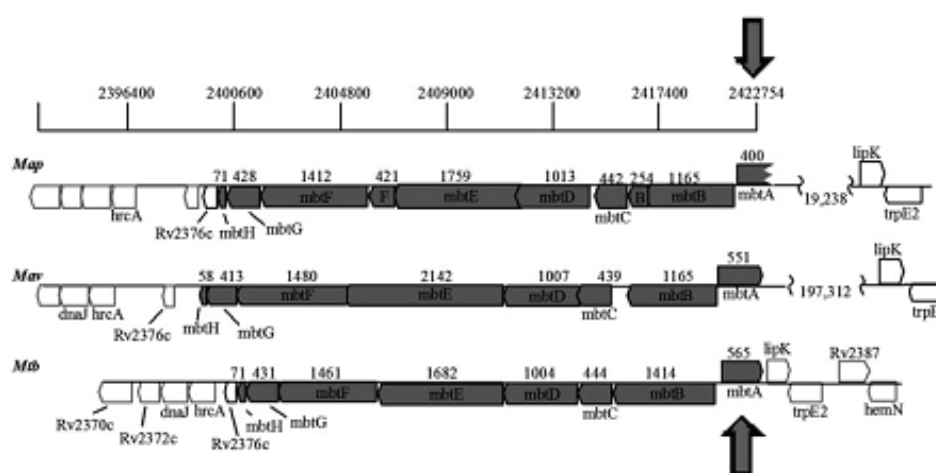
La dependencia a los metales es necesaria para el crecimiento de la mayoría de las bacterias y especialmente al hierro en el caso de las micobacterias patógenas. Para la entrada y utilización de éste al interior de la bacteria se necesita en primer lugar una fuente orgánica del mismo. A continuación, este hierro es quelado por los sideróforos y mediante un transporte transmembrana pasa al interior del citoplasma. Hay dos tipos de sideróforos, las micobactinas y las exoquelinas: los primeros son agentes internos secuestradores y los segundos vectores externos. Las exoquelinas son moléculas proteicas pequeñas que están presentes en el fluido extracelular, las cuales se liberan a altas concentraciones en condiciones

de deficiencia de hierro. Se han identificado exoquelinas tanto liposolubles como hidrosolubles y la función de las mismas en el caso de las micobacterias es la de adquirir el hierro presente en el hospedador en forma de ferritina a través de la pared celular bacteriana. Una vez ocurrido este proceso, a partir de ahí puede tener lugar el intercambio del metal quelado con el otro tipo de sideróforo (la micobactina), el cual tiene una localización intracelular y será el responsable de la formación de un depósito de hierro en el interior de la célula.

Las micobactinas son moléculas lipídicas de elevado peso molecular que presentan una parte central o armazón al cual se une el hierro. Debido a su insolubilidad en agua, estas estructuras altamente hidrofóbicas están confinadas a la membrana celular. Dentro de los Actinomicetales, las micobactinas únicamente se encuentran presentes en los géneros *Mycobacterium* y *Nocardia*. Sin embargo, las micobacterias son las únicas especies que contienen tanto las micobactinas como las exoquelinas, aunque con excepciones como son el caso de *M. a. paratuberculosis* y algunas cepas de *M. avium* (Cocito y col. 1994), en los que las micobactinas están ausentes. El responsable de la producción de micobactina y el transporte de hierro es un grupo o *cluster* de 10 genes (*mtbA-J*) que se describió en *M. tuberculosis* (Quadri y col. 1998), y de los cuales se han identificado homólogos en el genoma de *M. a. paratuberculosis* (Li y col. 2005). El análisis del genoma de *M. a. paratuberculosis* (Semret y col. 2004; Li y col. 2005) reveló la presencia de un espacio de 6,6 kb entre los genes *mbtJ* y *mbtI* y un espacio de 19,3 kb entre los genes *mbtA* y *mbtJ*, característica genética que podría ser responsable de la dependencia de micobactina en el medio de cultivo de *M. a. paratuberculosis*. Sin embargo, estos espacios también están presentes en *M. avium*, el cual es capaz (excepto algún caso) de producir micobactina (Cocito y col. 1994; Li y col. 2005). Asimismo, el análisis del genoma de *M. a. paratuberculosis* en comparación con el genoma de *M. tuberculosis* reveló la presencia de mutaciones en los marcos de lectura de los genes *mbtB* y *mbtE*, aunque estas mismas mutaciones también están presentes en el genoma de *M. avium*. No obstante, a pesar de la presencia de estas mutaciones los dominios funcionales se conservaron. Sin embargo, el gen *mbtA* es más corto (400 aminoácidos) en *M. a. paratuberculosis* en comparación con *M. tuberculosis* (565 aminoácidos) y *M. avium* (551 aminoácidos). Debido al truncamiento de este gen, el cual desempeña una función crucial en la cascada de reacciones que dan lugar a la producción de micobactina, se cree que la producción de ésta está atenuada en *M. a. paratuberculosis* (Li y col. 2005) (Figura 4). Por todo esto es necesaria la adición de la micobactina al medio de cultivo para el crecimiento de *M. a. paratuberculosis*. Por otro lado, el

efecto del truncamiento en el gen *mbtA* hace que *M. a. paratuberculosis* no capte el hierro del medio, por lo que se necesita añadir a su vez citrato férrico amónico en el medio de cultivo (Merkal y Curran, 1974). El cultivo de *M. a. paratuberculosis* se describe con más detalle más adelante en el apartado del diagnóstico de la enfermedad de Johne o paratuberculosis (páginas 64-67).

Figura 4. Esquema que representa la estructura del grupo de genes responsables de la producción de micobactina en *M. a. paratuberculosis*, *M. avium* y *M. tuberculosis* respectivamente. Encima de cada uno de los genes se indica la longitud de aminoácidos, observándose el truncamiento del gen *mbtA* (Li y col. 2005) (copyright 2005, National Academy of Sciences, USA).



La secuenciación del genoma completo de *M. a. paratuberculosis* (cepa secuenciada *M. a. paratuberculosis* K-10, con número de acceso al GenBank: AE016958) reveló, además del truncamiento en el gen *mbtA*, una secuencia linear simple compuesta por un total de 4.829.781 pb y con un contenido total en GC del 69,3% (Tabla 3) (Li y col. 2005).

Tabla 3. Resumen de las características del genoma de *M. a. paratuberculosis* en comparación con otras especies de micobacterias (Li y col. 2005).

Característica	Map	<i>M. avium</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. leprae</i>	<i>M. smegmatis</i>
Tamaño del genoma	4.829.781	5.475.738	4.411.532	4.345.492	3.268.203	6.988.209
Contenido G+C (%)	69,30	68,99	65,61	65,63	57,79	67,40
Genes que codifican proteínas (%)	91,30	NA	90,80	90,59	49,50	92,42
Marcos de lectura abiertos (ORFs)	4350	NA	3959	3953	1604	6897
Densidad genét. (pb/gen)	1112	NA	1114	1099	2037	1013
Long. media gen (pb)	1015	NA	1012	995	1011	936
ARNt	45	45	45	45	45	47
Operones ARNr	1	1	1	1	1	2

4. Factores de virulencia en *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

4. 1. Genes de entrada a células mamíferas (*mammalian cell entry genes, mce*)

Entre los factores de virulencia empleados por las bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium* destacan los genes de entrada a células mamíferas (*mammalian cell entry genes, mce*), cuyos productos de expresión génica (las proteínas *mce*) son esenciales para la entrada celular y supervivencia en el interior de los macrófagos (Parker y col. 1995; Flesselles y col. 1999; Haile y col. 2002; Gioffre y col. 2005; Casali y Riley, 2007; El-Shazly y col. 2007).

La importancia de estos genes *mce* en la virulencia de micobacterias se demostró experimentalmente tras observar que una cepa no patogénica de *Escherichia coli* en cuyo genoma se había insertado el gen *mce1A* de *M. tuberculosis* era capaz de invadir la línea celular HeLa (carcinoma del cuello de útero humano, *human cervical carcinoma*) (Arruda y col. 1993).

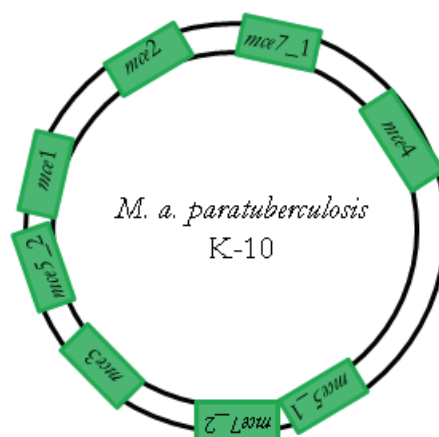
En la actualidad algunos grupos de investigación han producido mutantes en los que se han delecionado genes *mce* en cepas de *M. bovis* y de *M. tuberculosis*. Diferentes experimentos de invasión *in vitro* con éstos han demostrado que tanto su virulencia como su invasividad estaban atenuados (Flesselles y col. 1999). Más adelante, otro trabajo describió la presencia de diferencias en la histopatología producida por las cepas mutantes *mce* en comparación con la de las cepas salvajes (o *wildtype*) de *M. tuberculosis*; observándose la formación de granulomas aberrantes y una mayor proliferación linfocítica en ratones infectados con las cepas mutantes en comparación con las lesiones producidas por la cepa salvaje (Shimono y col. 2003).

En lo que respecta al estudio del papel de estos genes *mce* dentro del complejo MAC, un trabajo describió la existencia de una correlación directa entre la susceptibilidad de *M. a. avium* a determinados antibióticos, la morfología de sus colonias y la expresión de diferentes genes *mce*. En este mismo estudio concluyeron que los fenotipos más virulentos de *M. a. avium* presentaban una super-expresión de los genes *mce* (Cangelosi y col. 2006).

Todos los genes *mce* se encuentran repartidos a lo largo del genoma de las micobacterias en forma de operones o grupos constituidos por seis genes *mce* y dos genes *yrbE*, cuyas funciones son la producción de proteínas de unión a sustratos en el caso de los primeros y permeasas para el transporte a través de la membrana celular en el caso de los

segundos (Casali y Riley, 2007). En *M. a. paratuberculosis* estos genes se encuentran formando ocho operones que están distribuidos a lo largo de todo el genoma (Figura 5) y de los cuales, al igual que en *M. smegmatis*, los operones *mce5* y *mce7* están presentes en dos copias. Hasta la fecha no se han descrito cepas pertenecientes a *M. a. paratuberculosis* que presenten una delección natural de cualquiera de estos operones *mce*.

Figura 5. Operones *mce* distribuidos en el genoma de la cepa de referencia de *M. a. paratuberculosis* K-10 (Número de acceso al GenBank: AE016958; Referencia de la secuencia: NC_02944).



4.2. Proteínas PE (Prolina-ácido glutámico) y PPE (Prolina-prolina-ácido glutámico)

Otros de los genes con un posible papel en la patogénesis de las micobacterias son las proteínas miembros de la familia PE/PPE (dominios de prolina-ácido glutámico y prolina-prolina-ácido glutámico respectivamente, localizados en los dominios conservados y próximos al extremo N terminal). Estas proteínas son específicas de micobacterias y en *M. a. paratuberculosis* hay un total de seis proteínas PE y 36 proteínas PPE homólogas a las descritas en el genoma de *M. tuberculosis* y las cuales comprenden tan sólo un 1% de la totalidad del genoma de *M. a. paratuberculosis* (Li y col. 2005).

Estas proteínas PE/PPE se vieron expresadas en la superficie celular de *M. tuberculosis* y por lo tanto este hecho se asoció al posible papel en la variación antigénica de éste y como consecuencia una interferencia en la respuesta inmune del hospedador (Cole y col. 1998; Fleischmann y col. 2002; Brennan y col. 2003). Algunas de estas proteínas PPE se han visto involucradas en la virulencia de cepas de *M. a. avium* en ratones y en el crecimiento intracelular de este microorganismo en el interior de macrófagos (Li y col. 2005). En otro

estudio experimental realizado en *M. a. paratuberculosis* en el que se emplearon anticuerpos policlonales específicos y posteriormente se evidenció mediante inmunofluorescencia, se demostró que dos proteínas PPE (MAP1506 y MAP3420c) también eran expresadas en la superficie de microorganismos viables (Newton y col. 2009).

Además del papel de estas proteínas en la virulencia y patogénesis de micobacterias, las secuencias únicas y conservadas de los genes PE/PPE en *M. a. paratuberculosis* hacen que el empleo de algunos de ellos como diana para la detección de este microorganismo sea una alternativa para aumentar la especificidad y sensibilidad de las diferentes pruebas diagnósticas (Bannantine y col. 2004, Paustian y col. 2004; Mackenzie y col. 2009).

Por último, la presencia de mutaciones puntuales (*single nucleotide polymorphism*, SNPs) en las secuencias de los diferentes genes PE/PPE podría ser la causa de las diferencias en patogénesis observadas entre las distintas especies de micobacterias (Marri y col. 2006). Estos SNPs han sido empleados a su vez como diana para la identificación y caracterización de los distintos tipos de *M. a. paratuberculosis* I, II y III (Griffiths y col. 2008) (Ver capítulo 7.5, páginas 50-51).

4.3. Otros factores de virulencia

Entre otros factores de virulencia descritos en la literatura se encuentra la proteína de superficie celular de 35 kDa, a la cual se la atribuyó un posible papel en el proceso de interacción entre *M. a. paratuberculosis* y las células intestinales del hospedador (Bannantine y col. 2003). Más adelante se describió en *M. a. paratuberculosis* una isla de patogenicidad de 38 kDa, constituida por tres operones (*fep*, *mpt* y *sid*) y a la cual se la asignó un posible papel en el metabolismo del hierro (Stratmann y col. 2004).

Otro trabajo demostró la función desempeñada por la proteína homóloga de unión a la fibronectina (*fibronectin attachment protein homologue*, FAP-P) durante el proceso de invasión de las células M, localizadas en las placas de Peyer (Secott y col. 2004).

En otro estudio, en el que se emplearon modelos *in vivo* con ratones observaron que las cepas mutantes de *M. a. paratuberculosis* con disrupciones en los genes *fabG2_2*, *gcpE*, *impA*, *kdpC*, *papA2*, *pstA* o *umaA1* presentaban una atenuación en la virulencia en relación a la colonización de tejidos (Shin y col. 2006).

Recientemente también se han descrito otros genes asociados con la patogenia de *M. a. paratuberculosis*. Entre estos destaca el regulador *LuxR*, el cual se vio super-expresado en

M. a. paratuberculosis tras 1 h post-infección *in vitro* y se describió como responsable de la adaptación de este patógeno al hospedador durante el proceso de infección. Este regulador controló además la composición de la pared bacteriana mediante la súper-expresión de los genes *FadE8*, *LprL*, MAP1203 y MAP1420, así como la infra-regulación de los genes MAP2594, *mmpL2* y *pks12*, todos ellos a su vez determinantes de virulencia (Alonso-Hearn y col. 2009).

Finalmente, otro gen descrito en la literatura y posiblemente asociado a los distintos mecanismos de virulencia de *M. a. paratuberculosis* es el gen *pstA*. Este gen es un componente de la pared celular y está implicado en la formación de biopelículas (*biofilms*) y en la invasión intestinal de *M. a. paratuberculosis* en ganado vacuno (demostrado en un modelo experimental *in vivo*) (Wu y col. 2009).

5. Secuencias específicas de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

La secuenciación del genoma de *M. a. paratuberculosis* ha permitido la descripción de secuencias específicas para este microorganismo, las cuales han sido empleadas como herramienta para la identificación del mismo. Entre estas secuencias destacan:

F57. Secuencia de 620 pb con un contenido en GC del 58,9% que se encuentra presente en una sola copia en el genoma de *M. a. paratuberculosis* (Número de acceso al GenBank X70277) (Poupart y col. 1993). Esta secuencia se ha empleado como diana en la técnica de amplificación por PCR para la identificación de *M. a. paratuberculosis* (Coetsier y col. 2000; Vansnick y col. 2004; Godfroid y col. 2005; Tasara y Stephan, 2005; Tasara y col. 2005; Herthnek y col. 2006 ; Stephan y col. 2007; Möbius y col. 2008; Schonenbrucher y col. 2008; Slana y col. 2008; Castellanos y col. 2009; Ireng y col. 2009; Salgado y col. 2009; Slana y col. 2009), aunque esta secuencia también se ha establecido como diana en otras técnicas moleculares como en la amplificación isotérmica mediada por bucle (*loop-mediated isothermal amplification*, LAMP) (Enosawa y col. 2003). En un estudio reciente se demostró la alta especificidad de este elemento en cuanto a la identificación de *M. a. paratuberculosis* (Möbius y col. 2008), sin embargo, la presencia de tan sólo una única copia del mismo hace que su sensibilidad sea reducida en comparación con otras dianas moleculares.

ISMav2. Secuencia de inserción específica que fue identificada inicialmente mediante análisis diferencial representacional (*representational differential analysis*, RDA) en aislados de *M. a. paratuberculosis*, detectándose al menos tres copias de ésta en el genoma (Strommenger y col. 2001). La detección de esta secuencia se ha empleado desde su descripción inicial en varios estudios (Stratmann y col. 2002; Shin y col. 2004; Stratmann y col. 2006; Schonenbrucher y col. 2008). Sin embargo, la especificidad de esta secuencia como diana para la identificación única de *M. a. paratuberculosis* es reducida, ya que en un estudio reciente describieron la amplificación por PCR de esta secuencia en otras micobacterias como *M. fortuitum*, *M. smegmatis* y otras dos especies no pertenecientes al género *Mycobacterium* (Möbius y col. 2008).

HspX Este gen se encuentra presente en el genoma de *M. a. paratuberculosis* en una única copia lo que, al igual que en el caso de F57, reduce considerablemente la sensibilidad en cuanto a su empleo para fines de identificación de este organismo (Ellingson y col. 1998). En un estudio se describió la presencia de la proteína resultado de la expresión de este gen en macrófagos de origen bovino y murino infectados con *M. a. paratuberculosis* (Bannantine y Stabel, 2000). Este gen ha sido además empleado en diferentes estudios en la identificación de *M. a. paratuberculosis* desde su descripción inicial (Miller y col. 1999; Ellingson y col. 2000; Enosawa y col. 2003; Ellingson y col. 2004; Ellingson y col. 2005; Brey y col. 2006; Clark y col. 2006).

Genes 251 y 255. La secuenciación parcial del genoma de *M. a. paratuberculosis* y su comparación con el de *M. avium* reveló un total de 21 secuencias únicas en *M. a. paratuberculosis*, entre las cuales se encontraron los genes 251 y 255. Estas últimas fueron corroboradas como específicas de *M. a. paratuberculosis* en el mismo estudio mediante hibridación de ADN, en el cual se incluyeron además aislados de *M. a. avium*, *M. bovis* BCG, *M. fortuitum* y *M. intracellulare* (Bannantine y col. 2002). El empleo de estos genes para la identificación de *M. a. paratuberculosis* se ha realizado en diferentes trabajos desde entonces (Motiwala y col. 2003; Motiwala y col. 2004; Rajeev y col. 2005; Möbius y col. 2008).

ISMpa1. Esta secuencia de inserción, descrita en 2004 (Olsen y col. 2004) tiene un tamaño de 1500 pb y un único marco de lectura abierto (*open reading frame*, ORF), el cual codifica para una transposasa. Esta secuencia se encuadra dentro de la familia de secuencias de inserción IS110, y aunque está presente en todos los aislados de *M. a. paratuberculosis*, también se

encontró presente en algunos aislados de *M. a. hominissuis* de origen porcino (Olsen y col. 2004). En otro estudio posterior se confirmaron los resultados previamente descritos y se describió la presencia de esta secuencia en otro grupo de aislados de *M. a. hominissuis* de origen porcino, confirmándose por tanto que esta secuencia no era específica de *M. a. paratuberculosis* (Johansen y col. 2007).

ISMAP02. Esta secuencia de inserción de 1674 pb fue identificada en el genoma de *M. a. paratuberculosis* en un total de seis copias, proponiéndose por ello el empleo de la misma como una posible diana alternativa al empleo del IS900 (Paustian y col. 2004). Tras su descripción, esta secuencia se ha empleado en diferentes estudios (Stabel y Bannantine, 2005; Ireng y col. 2009; Sohal y col. 2009).

IS900. Secuencia de inserción descrita con mayor detalle en el siguiente apartado de elementos repetitivos (ver páginas 26-27).

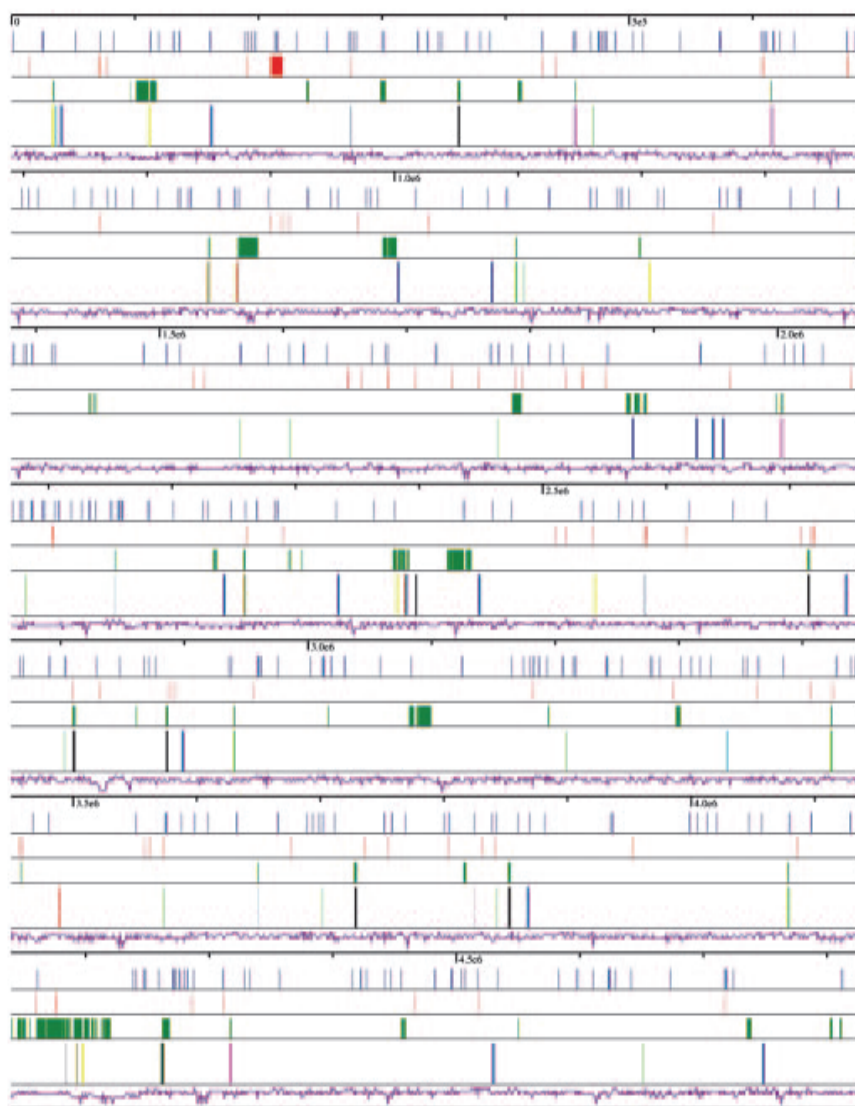
6. Elementos repetitivos

6.1. Secuencias de inserción (*Insertion sequences, IS*)

En los genomas bacterianos hay dos formas de repeticiones de ADN, las repeticiones en tándem y las repeticiones dispersas. Las repeticiones dispersas a su vez se corresponden con genes duplicados o elementos genéticos móviles presentes en múltiples copias, como las secuencias de inserción (Hatfull y Jacobs, 2000). La movilidad de estos elementos constituye una fuente de plasticidad genética, pudiendo ser responsables a su vez de una gran variedad de reestructuraciones cromosómicas además de deleciones (Mahillon y Chandler, 1998). Estas IS además contienen genes únicamente relacionados con funciones de inserción y están distribuidas a lo largo de los genomas de los organismos procariotas (Green y col. 1989). En el genoma de *M. a. paratuberculosis*, 72,2 Kb (1,5%) se corresponden con estos elementos repetitivos de ADN. Así, en el genoma secuenciado de *M. a. paratuberculosis* (cepa de referencia K-10) hay descritas 17 copias de la secuencia de inserción IS900, siete copias de IS1311, tres copias de ISMap2 y 16 IS adicionales.

La mayoría de estas IS adicionales son secuencias homólogas a las ya descritas en los genomas de *M. avium*, *M. bovis*, *M. marinum* y *M. tuberculosis*, aunque algunas de ellas son únicas de *M. a. paratuberculosis*, como es el caso de ISMAP02 (descrita en el apartado de secuencias específicas de *M. a. paratuberculosis*, página 23). En la descripción inicial de las IS se postuló que éstas se integraban preferiblemente en regiones intergénicas, evitando consigo la disrupción de genes esenciales (Perret y col. 1997), hecho que se confirmó en la secuencia de *M. a. paratuberculosis* K-10 (Li y col. 2005) (Figura 6).

Figura 6. Representación lineal de las regiones repetitivas y únicas en el genoma de *M. a. paratuberculosis* K-10 (Li y col. 2005). Parte superior: histograma azul, regiones de repetición en tándem de número variable/repeticiones directas (*variable number tandem repeats/direct repeats*, VNTR/DR); histograma rojo, repeticiones de secuencia corta (*short sequence repeats*, SSR); histograma verde, regiones específicas; histograma multicolor, IS (IS900 en azul; MAP01 en aguamarina; MAP02 en gris; MAP03 en rosa; MAP04 en verde; MAP05 en púrpura; MAP06 en negro; MAP07 en naranja; MAP08 en rojo; MAP09 en rosa claro; MAP10 en púrpura claro; MAP11 en beis; MAP12 en marrón; MAP13 en fucsia; MAP14 en aguamarina claro, MAP15 en gris claro; MAP16 en verde oscuro; IS1311 en marrón; ISMav2 en azul claro; REP: IS descrita previamente en el genoma de *M. tuberculosis* (Gordon y col. 1999), representada en verde claro. Histograma púrpura, contenido en GC. Figura obtenida mediante el software GENESCE (DNASTar, Madison, WI, USA) (copyright 2005, National Academy of Sciences, USA).



- IS900

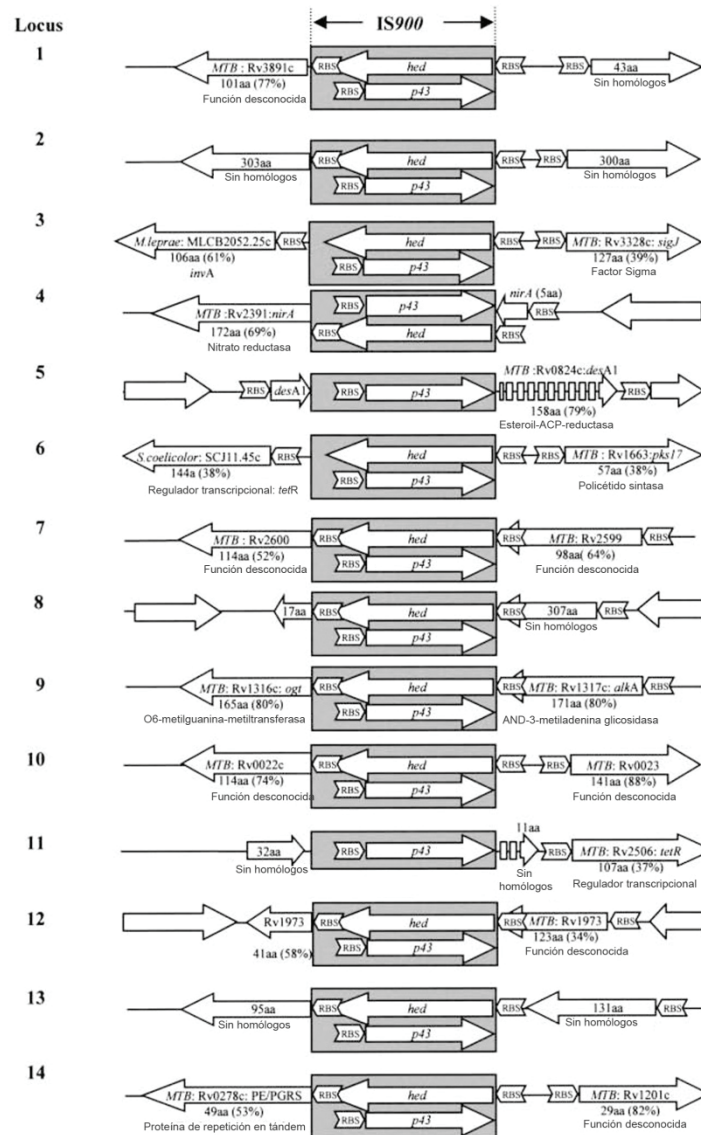
Dentro de todas las IS definidas dentro del género *Mycobacterium*, IS900 fue la primera descrita e identificada, secuencia de 1451 pb que se encuentra distribuida en un total de 15-20 copias en el genoma de *M. a. paratuberculosis* (McFadden y col. 1987; Green y col. 1989). El contenido en GC de la IS y de la región adyacente es del 66% y además presenta un ORF de 1197 pb (localizado entre los nucleótidos 236 y 1432) que codifica para una transposasa hipotética de 399 aminoácidos en una cadena, p43 (Tizard y col. 1992) y una proteína de función desconocida en la otra, *bed* (Doran y col. 1994) (Figura 7). Esta IS900 se inserta en una dirección dentro de una región consenso en loci altamente conservados en el genoma de *M. a. paratuberculosis* (Bull y col. 2000).

Las secuencias adyacentes al IS900 no contienen repeticiones directas ni repeticiones invertidas, por lo que se ha descrito en la literatura que esta IS puede haber tenido su origen en un micobacteriófago, ya que en la mayoría de los IS se ha descrito la movilidad de los mismos entre los genomas de fagos, plásmidos y cromosomas (Green y col. 1989).

La presencia o ausencia de las IS han servido para la subtipificación de los miembros de MAC (Bartos y col. 2006) y en concreto el IS900 se ha empleado como secuencia diana en el diagnóstico e identificación de *M. a. paratuberculosis* (Turenne y col. 2008). El empleo de esta IS como diana para la detección de *M. a. paratuberculosis* se ha llevado a cabo a través de diferentes técnicas moleculares rápidas como PCR empleando oligonucleótidos hibridados a un fluorocromo (Rowbotham y col. 1995), PCR múltiple (Al-Shamali y col. 1997; Bull y col. 2000; Irengue y col. 2009), PCR anidada (Englund y col. 1999; Englund y col. 2001; Erume y col. 2001; Ikonopoulou y col. 2004; Möbius y col. 2008), PCR-*in situ* en tejidos de origen ovino (Sanna y col. 2000), PCR a tiempo real empleando sondas fluorescentes (Englund y col. 2001; Fang y col. 2002), PCR dirigida desde el elemento IS900 hacia las regiones flanqueantes (Collins y col. 2002), PCR dúplex e hibridación específica a las localizaciones genómicas de integración del IS900 (Ozbek y col. 2003) y separación inmunomagnética y PCR dirigida a IS900 (Djonjevic y col. 2003). Por último, esta IS también se ha empleado como diana no solo para la identificación de *M. a. paratuberculosis* sino también en su caracterización mediante otras técnicas moleculares tradicionales para epidemiología como la restricción de fragmentos polimórficos largos (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) y su hibridación a la secuencia IS900, IS900-RFLP (Roiz y col. 1995; Bauerfeind y col. 1996; Pavlik y col. 1999; Whittington y col. 2000; Thibault y col. 2007;

Möbius y col. 2008) y a través del análisis de mutaciones presentes en la secuencia (Willemsen y col. 1999; Whittington y col. 2001; Pickup y col. 2005; Sivakumar y col. 2005; Bhide y col. 2006; Pickup y col. 2006; Semret y col. 2006; Scanu y col. 2007; Castellanos y col. 2009; Sohal y col. 2009).

Figura 7. Representación gráfica de los 14 loci en los que se inserta IS900 en el genoma de *M. a. paratuberculosis* (Bull y col. 2000). Los ORF y las direcciones de transcripción hipotéticas se reflejan mediante flechas, mientras que las flechas discontinuas reflejan ORFs hipotéticos que están interrumpidos por la inserción de IS900. La flecha que representa a la proteína hipotética *hed* está omitida en los loci en los cuales *hed* no se transcribe, debido a la ausencia de sitio de unión al ribosoma (*Ribosomal binding site*, RBS) (locus 5) o dirección de transcripción genómica desconocida (locus 11).

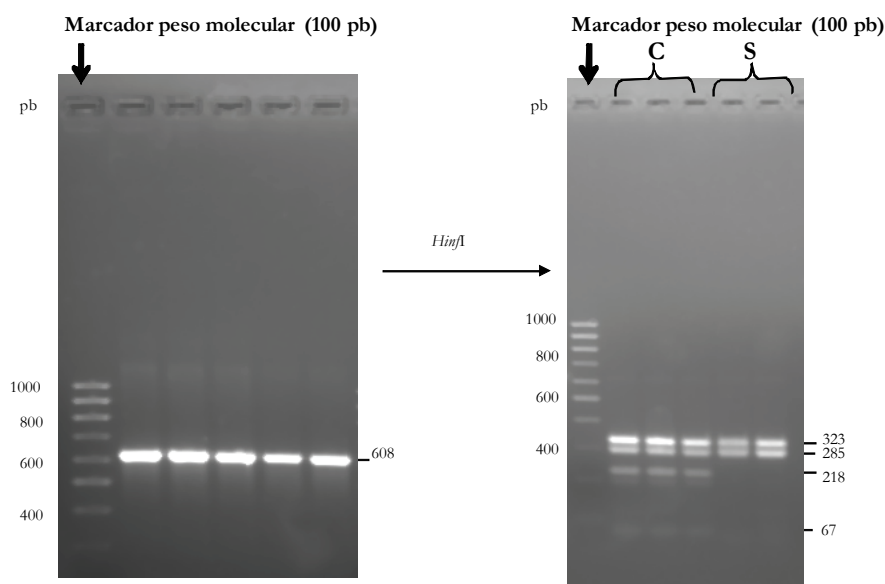


- IS1311

La IS1311 es otra secuencia de inserción, presente en siete copias en el genoma de *M. a. paratuberculosis*, que se caracteriza por compartir una homología del 85% con la IS1245 (Collins y col. 1997; Whittington y col. 1998), aunque a pesar de esta homología ésta última no se encuentra presente en el genoma de *M. a. paratuberculosis* (Johansen y col. 2005).

Inicialmente, el análisis de las secuencias de IS1311 de cuatro aislados del tipo ovino (*sheep type*) y bovino (*cattle type*) (clasificación en tipos I, II y III no disponible en este estudio; ver apartado 7.2, páginas 45-48) revelaron la presencia de SNPs en la secuencia IS1311 que eran específicos para cada uno de los aislados. Así, se describió la presencia de C o T en la posición 223 en algunas de las copias de IS1311 de las cepas de tipo bovino y únicamente una C en las de tipo ovino. Basado en este principio se desarrolló una técnica de PCR y restricción enzimática, PCR-REA (*restriction enzymatic analysis*) dirigida al extremo 5' de la secuencia, considerada específica para la caracterización de los aislados de *M. a. paratuberculosis* (Whittington y col. 1998) (Figura 8).

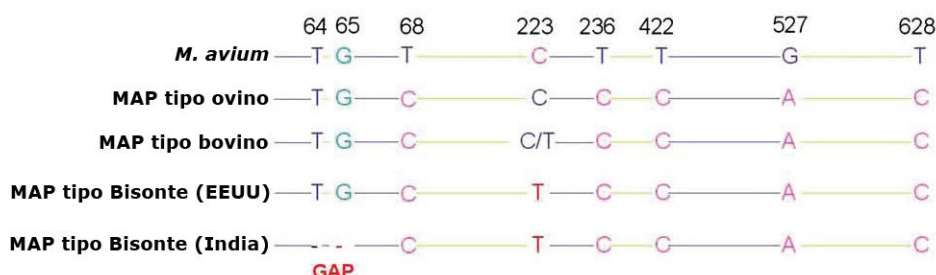
Figura 8. Gel de electroforesis en que se representa el perfil de restricción enzimática para las cepas bovinas (C) y las cepas ovinas (S) del producto de amplificación por PCR de la IS1311 tras la digestión enzimática con la enzima *HinfI* (imagen obtenida en el centro VISAVET).



Esta técnica de PCR-REA IS1311 ha sido empleada para la tipificación de los aislados de *M. a. paratuberculosis*, ya que la citada mutación (posición 223 pb) ha sido localizada de manera altamente conservada (Motiwala y col. 2004; Sevilla y col. 2005; de Juan

y col. 2006; Kumar y col. 2008; Yadav y col. 2008; Singh y col. 2009). Aunque recientemente, el análisis de esta secuencia IS1311 en un aislado de *M. a. paratuberculosis* del tipo ovino obtenido de heces de un rebaño de bisontes reveló por primera vez la inserción de tres bases (CA-T) en la posición 32 de la secuencia de inserción IS1311 (Sibley y col. 2007). El denominado *M. a. paratuberculosis* tipo bisonte (*bison type*, B), fue descrito en India y EEUU y se diferenció únicamente del tipo bovino por la presencia de una T en la posición 223 del IS1311 (Whittington y col. 2001; Singh y col. 2008) (Figura 9). Recientemente, los aislados del tipo B de la India se han diferenciado de los de EEUU por la identificación de una delección de los nucleótidos TG en las posiciones 64 y 65 de la secuencia de inserción IS1311 en el caso de los primeros únicamente (Sohal y col. 2009).

Figura 9. Adaptación de la figura en la que se comparan las secuencias IS1311 de *M. a. paratuberculosis* tipo B con las de otros aislados de *M. a. paratuberculosis* (Sohal y col. 2009).



Sin embargo, y a pesar de la presencia de estas mutaciones puntuales o SNPs en la secuencia de IS1311 de las cepas tipo B el genotipo o perfil genético obtenido en estas cepas mediante las técnicas de microarray y electroforesis en campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) es el mismo al de las cepas tipo bovinas (Sevilla y col. 2007; Paustian y col. 2008).

6.2. Repeticiones de secuencia corta (*Short sequence repeat*, SSR)

Las repeticiones de secuencia corta, SSR o microsatélites se definen como regiones homopoliméricas de un solo nucleótido (repetición de mononucleótido) o regiones multiméricas con repeticiones de dos a seis nucleótidos (repeticiones homogéneas o heterogéneas) (van Belkum y col. 1998; Amonsin y col. 2004; Sreenu y col. 2007). Las

repeticiones de mononucleótidos son las más abundantes en los genomas de las micobacterias, encontrándose entre 160-170 repeticiones por cada kb, sin embargo los SSR de seis pares de bases son las menos abundantes, con tan sólo una repetición o ninguna por cada kb. Además, los SSR de tres y seis nucleótidos se encuentran en mayor proporción en las regiones codificantes, mientras que los de 1, 2, 4 y 5 nucleótidos se encuentran en mayor proporción en las regiones no codificantes (Sreenu y col. 2007).

La variabilidad de estas repeticiones puede ser debida al desapareamiento entre los nucleótidos al desplazarse una hebra de ADN sobre la otra [lo que puede dar lugar a la pérdida o ganancia de una unidad en la pauta de lectura durante el proceso de transcripción, originándose la pérdida del codon de inicio o mutaciones en las proteínas codificadas, proceso conocido como *slipped-strand mispairing* (Levinson y Gutman, 1987; Schlotterer y Tautz, 1992)], a la inestabilidad genética de fragmentos polinucleótidos (especialmente poli G-T) o a la recombinación de ADN entre secuencias repetitivas homólogas.

Las regiones de repeticiones en tándem de mono-, di- y trinucleótidos son generalmente las más diversas en los genomas bacterianos, mientras que por el contrario las repeticiones más complejas y de mayor tamaño presentan un menor índice de diversidad (Sreenu y col. 2007). Además, se estima que la frecuencia de las mutaciones en estas regiones en forma de inserciones y deleciones de sus unidades de repetición es mayor que la frecuencia con la que tiene lugar la sustitución de bases (Schlotterer y Tautz, 1992).

Estas repeticiones se han encontrado en los genes responsables de la virulencia en algunas bacterias patógenas, pudiendo indicar una posible implicación en la patogenia de las mismas (Moxon y col. 1994). Por otro lado, estos microsatélites actúan también como reguladores génicos, modulando la actividad transcripcional de los genes mediante la pérdida o ganancia de repeticiones en las regiones promotoras (van Ham y col. 1993).

El análisis de los SSR se ha empleado en la tipificación de los distintos aislados de *M. a. paratuberculosis* (Amonsín y col. 2004; Ghadiali y col. 2004; Motiwala y col. 2004; Corn y col. 2005; Motiwala y col. 2005; Cernicchiaro y col. 2008; Sevilla y col. 2008; Thibault y col. 2008; El-Sayed y col. 2009; Möbius y col. 2009; Singh y col. 2009). Este método de caracterización genética presenta un elevado índice de discriminación genética, alberga resultados que son fácilmente reproducibles, no ambiguos y en ocasiones se ha descrito una asociación entre el perfil alélico de SSR y el hospedador (Amonsín y col. 2004; Singh y col. 2009). Sin embargo, esta asociación entre hospedador y perfil alélico no se observó en el estudio presentado por Sevilla y colaboradores (Sevilla y col. 2008) en el que analizaron los

SSR constituidos por los residuos de 7Gs a los de 14Gs. Esta correlación tampoco fue hallada entre los perfiles resultantes tras la combinación de MIRU-VNTR-SSR en aislados de origen bovino y ovino obtenidos de Francia. Sin embargo, la combinación de estos tres métodos permitió la diferenciación de las cepas en 31 perfiles, en contraste con los 13 perfiles obtenidos tras la aplicación de MIRU-VNTR (Thibault y col. 2008).

A pesar de esto, esta técnica presenta la limitación de la obtención de aislados no tipificables en el caso de la presencia de mutaciones o deleciones en las posiciones genómicas donde hibridan los oligonucleótidos (Amonsin y col. 2004). Además se ha evidenciado experimentalmente que las regiones flanqueantes a los loci SSR (en el que hibridan los oligonucleótidos) son susceptibles de mutaciones con una mayor frecuencia (Orti y col. 1997). Por otro lado, la técnica de SSR está basada en la secuenciación de fragmentos de ADN (no siempre disponible o accesible para algunos laboratorios de diagnóstico) y la posterior interpretación de las secuencias requiere una cuidadosa lectura, que en ocasiones necesita ser contrastada por más de un analista (Thibault y col. 2008).

6.3. Repeticiones en tándem de número variable (*Variable number tandem repeats, VNTR*)

Las secuencias de ADN repetidas en forma de tandem y que se encuentran presentes en los genomas tanto de organismos procariotas como eucariotas reciben el nombre de repeticiones en tándem en número variable (*variable number tandem repeats, VNTR*) o regiones hipervariables (*hypervariable regions, HVR*) (Jeffreys y col. 1985; Supply y col. 2000). Los VNTR se encuentran enmarcados dentro del grupo de elementos repetitivos dispersos en el genoma, en el cual también se encuentran las unidades de repetición intergénicas (*intergenic repeat units, IRS*) (Sharples y Lloyd, 1990), las secuencias “box C” (Bachelier y col. 1997), secuencias extra-génicas palindrómicas repetitivas (*repetitive extragenic palindromes, REPs*) (Stern y col. 1984) y las unidades palindrómicas (*palindromic units, PUs*) (Higgins y col. 1988). Estas regiones se caracterizan por la variación en el número de copias que difiere entre individuos y las cuales se detectan mediante una PCR en la que los oligonucleótidos están dirigidos a las regiones adyacentes (van Belkum y col. 1998; Keim y col. 2000).

Los VNTR presentan además un gran índice de variabilidad genética y por lo tanto presentan un poder discriminativo alto (Keim y col. 2000). Estos se clasifican en micro (SSR)

y minisatélites en función de su longitud y la secuencia de repetición (Deka y col. 1992), presentando los primeros secuencias entre 1-13 pb y los segundos de 10-100 pb.

Estos VNTR presentan una mayor utilidad como herramienta para la subtipificación molecular de los diferentes aislados en el caso de organismos procariotas que presentan un bajo índice de heterogeneidad genética y un elevado índice de estabilidad genética (Lindstedt y col. 2005). Así, en el caso de las micobacterias, los VNTR se han empleado para la subtipificación en algunas de las especies como en *M. africanum* (Frothingham y col. 1999; Viana-Niero y col. 2001), *M. a. paratuberculosis* (Overduin y col. 2004; Motiwala y col. 2006; Thibault y col. 2007; Möbius y col. 2008; Thibault y col. 2008; Möbius y col. 2009; El-Sayed y col. 2009; Stevenson y col. 2009; Castellanos y col. 2010) y miembros del complejo *M. avium* (Romano y col. 2005; Moriyama y col. 2006; Kazumi y col. 2007; Tsunematsu y col. 2008; Inagaki y col. 2009; Kikuchi y col. 2009; Millán y col. 2010), *M. bovis* (Roring y col. 2002; Parra y col. 2003; Smith y col. 2003; Gibson y col. 2004; Roring y col. 2004; Hilty y col. 2005; Parra y col. 2005; Skuce y col. 2005; Allix y col. 2006; Lari y col. 2006; Ameni y col. 2007; Evans y col. 2007; Jeon y col. 2008; Martínez y col. 2008; Michel y col. 2008; Muller y col. 2008; Ojo y col. 2008; Romero y col. 2008; Tadayon y col. 2008), *M. canettii* (Fabre y col. 2004), *M. caprae* (Prodinger y col. 2005), *M. leprae* (Groathouse y col. 2004; Truman y col. 2004; Weng y col. 2006; Liu y col. 2007; Kimura y col. 2009; Matsuoka y col. 2009; Sakamuri y col. 2009; Torres-Avila y col. 2009), *M. microti* (Smith y col. 2009), *M. pinnipedii* (Moser y col. 2008), *M. tuberculosis* (Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998; Bifani y col. 1999; Kremer y col. 1999; Barlow y col. 2001; Gascoyne-Binzi y col. 2001; Sola y col. 2001; Chanchaem y Palittapongarnpim, 2002; Drobniewski y col. 2002; Le Fleche y col. 2002; Skuce y col. 2002; Spurgiesz y col. 2003; Banu y col. 2004; Easterbrook y col. 2004; Shamputa y col. 2004; Sun y col. 2004; Warren y col. 2004; García de Viedma y col. 2005; Kremer y col. 2005; Nikolaevskii y col. 2005; Prodinger y col. 2005; Smittipat y col. 2005; Surikova y col. 2005; van Deutekom y col. 2005; Yan y col. 2005; Zozio y col. 2005; Filliol y col. 2006; Gutierrez y col. 2006; Kam y col. 2006; Nikolayevskyy y col. 2006; Sajduda y col. 2006; Supply y col. 2006; Ali y col. 2007; Billamas y col. 2007; Cavusoglu y col. 2007; Chai y col. 2007; Godreuil y col. 2007; Iwamoto y col. 2007; Lazzarini y col. 2007; Martín y col. 2007; Menéndez y col. 2007; Tazi y col. 2007; Umubyeyi y col. 2007; Wada y col. 2007; Yokoyama y col. 2007; Alonso-Rodríguez y col. 2008; Fang y col. 2008; Hanekom y col. 2008; Homolka y col. 2008; Maeda y col. 2008; Maes y col. 2008; Mokrousov y col. 2008; Murase y col. 2008; Valcheva y col. 2008; Zhang y col. 2008; Akhtar y col. 2009; Allix-Beguec

y col. 2008; Jiao y col. 2008; Godreuil y col. 2009; Abadia y col. 2009; Affolabi y col. 2009; Alexander y col. 2009; Dou y col. 2009; Lu y col. 2009; Olsen y col. 2009; Perdigao y col. 2009; Stavrum y col. 2009; Tafaj y col. 2009; Valvatne y col. 2009; Wada e Iwamoto, 2009; Yindeeyoungyeon y col. 2009; Yun y col. 2009) y *M. ulcerans* (Ablordey y col. 2005; Hilty y col. 2006; Stragier y col. 2006; Lavender y col. 2008; Williamson y col. 2008).

En lo que respecta a la subtipificación molecular de *M. a. paratuberculosis*, Overduin y colaboradores (Overduin y col. 2004) describieron inicialmente un total de ocho loci VNTR (VNTR-1067, 1605, 1658, 2495, 3249, 3527, 7661, 9425) que analizaron en 49 aislados de *M. a. paratuberculosis*. De estos VNTR, tres no presentaron diferencias, cuatro dieron lugar a dos variantes alélicas (VNTR-1605, 1658, 3249 y 3527) y tan sólo un VNTR reveló tres variantes (VNTR-1067). En otro estudio posterior (Romano y col. 2005) se incluyeron seis loci MIRU-VNTR (ver apartado 6.4 de MIRU, páginas 35-39), cuatro con estructura de MIRU [MIRU-4 (MAP2045c-PyrH), MIRU-5, (MAP3318c-MAP3319) (Bull y col. 2003), MIRU-6 (MAP1837c-MAP1838), VNTR-1605 (Overduin y col. 2004), MIRU-7 (AccD2-FadE13), VNTR-3527 (Overduin y col. 2004)] y dos loci con estructura de VNTR [VNTR-8 (MAP3428c-DeoD), VNTR-11 (MAP2793-MAP2794)]. Estos loci se analizaron en 26 aislados de *M. a. paratuberculosis* y 21 aislados de *M. a. hominissuis* obtenidos de Argentina. El análisis de los resultados reveló la ausencia de variabilidad alélica en los aislados de *M. a. paratuberculosis* incluidos y 15 perfiles alélicos diferentes en los aislados de *M. a. hominissuis*. En 2007, Thibault y colaboradores (Thibault y col. 2007) describieron ocho loci diferentes en una colección de 183 aislados de *M. a. paratuberculosis* obtenidos de 10 países diferentes. De los ocho loci analizados, seis presentaron estructura de VNTR (3, 7, 10, 25, 32 y 47) y dos estructura de MIRU (X3 y 292), y la combinación de los mismos reveló 21 perfiles diferentes; en 13 de éstos perfiles se agruparon 175 aislados y los otros ocho perfiles restantes fueron únicos para algunos de los aislados. En otro estudio basado en el empleo de MIRU-VNTR como herramienta de subtipificación molecular (Möbius y col. 2008) se incluyeron 71 aislados de *M. a. paratuberculosis* obtenidos de Alemania. En este trabajo examinaron los loci MIRU-1, 2, 3, 4, VNTR-292 (Bull y col. 2003; Thibault y col. 2007) y VNTR-3, 7, 25, 32, 47 (Thibault y col. 2007). De éstos, MIRU-4 no presentó polimorfismo en cuanto al número de repeticiones entre los aislados de *M. a. paratuberculosis* analizados, por lo que no fue incluido en el análisis final, análisis que reveló un total de 15 perfiles diferentes entre los 71 aislados analizados.

En otro trabajo (El-Sayed y col. 2009) analizaron la diversidad genética de 34 aislados de *M. a. paratuberculosis* obtenidos de Alemania, empleando para ello 15 loci MIRU-VNTR [MIRU-1, 2, 3, 4, 5, 11 (Bull y col. 2003), MIRU-4-ARG, MIRU-6, 7, VNTR-8 (Romano y col. 2005), VNTR1067, 1605, 1658, 3249 y 3527 (Overduin y col. 2004)]. De todos estos, once loci (MIRU-1, 4, 4-ARG, 5, 6, 7, 11, VNTR-8, VNTR-1067, VNTR-1605 y VNTR-3249) no presentaron variación polimórfica alguna. Los únicos loci que presentaron polimorfismos fueron MIRU-2, 3, VNTR-3527 y VNTR-1658 (éste último dirigido a la misma región que el MIRU-3) (Tabla 4).

Tabla 4. Lista de MIRU-VNTR descritos como loci diferentes en la literatura y empleados en la caracterización molecular de los miembros de MAC pero dirigidos a la misma región del genoma.

Alias MIRU-VNTR	Referencia	Localización en el genoma de <i>M. a. paratuberculosis</i> K-10 (pb)
VNTR-3527	(Overduin y col. 2004)	1,487.484-1,487.217
MIRU-7 ARG	(Romano y col. 2005)	1,487.371-1,487.223
VNTR-1605	(Overduin y col. 2004)	2,017.648-2,017.145
MIRU-6 ARG	(Romano y col. 2005)	2,017.211-2,017.300
MIRU-2	(Bull y col. 2003)	3,253.835-3,253.653
VNTR-292	(Thibault y col. 2007)	3,253.590-3,253.889
VNTR-3249	(Overduin y col. 2004)	3,688.744-3,689.086
MIRU-5 ARG	(Romano y col. 2005)	3,688.831-3,688.943
VNTR-14	(Romano y col. 2005)	4,279.751-4,279.642
VNTR-10	(Thibault y col. 2007)	4,279.553-4,279.855
MIRU-3	(Bull y col. 2003)	4,441.879-4,442.008
VNTR-1658	(Overduin y col. 2004)	4,441.863-4,442.173
X-3	(Thibault y col. 2007)	4,441.875-4,442.070
VNTR-2495	(Overduin y col. 2004)	4,496.800-4,496.320
VNTR-22	(Romano y col. 2005)	4,496.634-4,496.467
VNTR-27	(Romano y col. 2005)	4,495.855-4,496.718

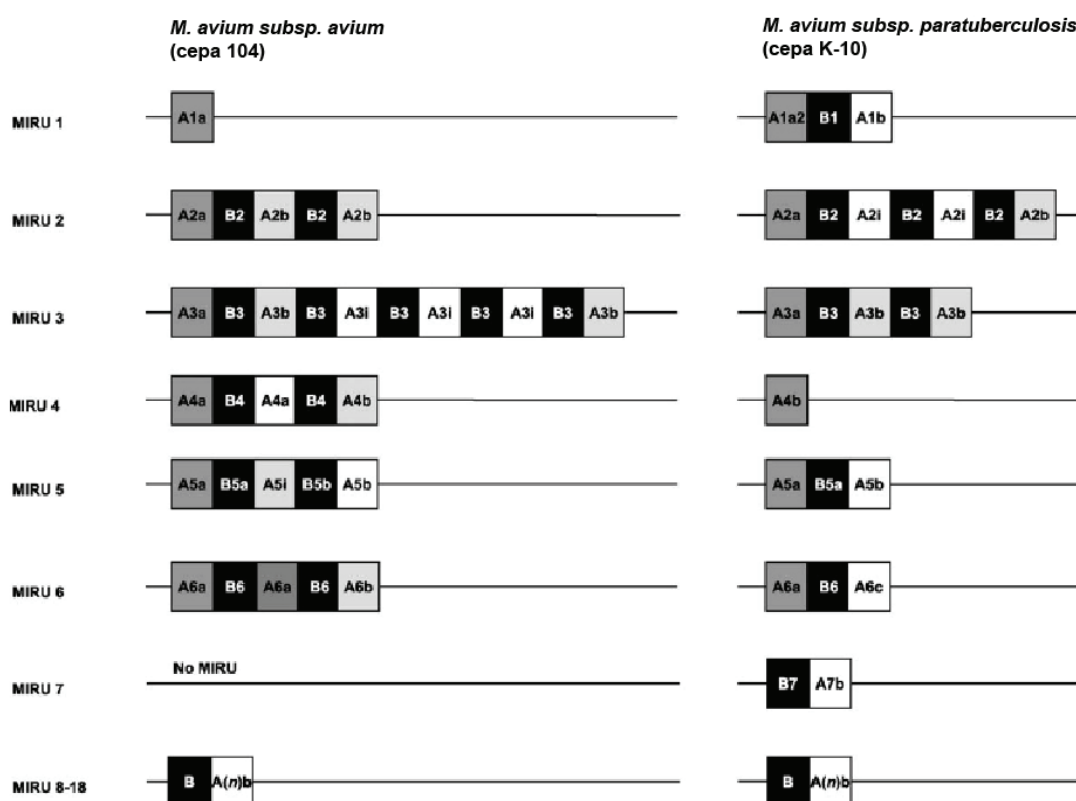
El último estudio en el que se han empleado MIRU-VNTR es el realizado en 147 aislados de *M. a. paratuberculosis* obtenidos de siete países europeos diferentes. La combinación de ocho loci (VNTR-3, 7, 10, 25, 32, 47, 292 y X3) dio lugar a 23 perfiles diferentes, con un índice de discriminación de 0,664 (Stevenson y col. 2009).

6.4. Unidades repetitivas intergénicas dispersas de micobacterias (*Mycobacterial interspersed repetitive units*, MIRU)

Las unidades repetitivas intergénicas dispersas de micobacterias (MIRU) forman parte de los elementos repetitivos dispersos y se clasifican en tres grupos (del I al III) en base a su secuencia, organización y longitud, la cual varía entre 46 y 101 pb [denominadas secuencias minisatélites (Bull y col. 2003)]. La primera descripción de los MIRUs se produjo en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (Supply y col. 1997), observándose un total de 65 copias localizadas en 41 loci. Estos MIRU también se han descrito en los genomas de *M. bovis*, *M. leprae* y los miembros de MAC (Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998; Supply y col. 2000; Mazars y col. 2001; Chanchaem y Palittapongarnpim, 2002; Roring y col. 2002; Savine y col. 2002; Bull y col. 2003; Sola y col. 2003; Romano y col. 2005; Thibault y col. 2007; Thibault y col. 2008; Möbius y col. 2008; Inagaki y col. 2009; Möbius y col. 2009). La mayoría de ellos contienen marcos de lectura abiertos (*open reading frames*, ORF) y el codon de iniciación se superpone con el de iniciación del gen adyacente, transcribiéndose ambos en la misma dirección (Supply y col. 1997). Estos MIRUs aparecen en forma de repeticiones en tándem y presentan polimorfismos en cuanto al número de copias, probablemente debido al desapareamiento de los nucleótidos al desplazarse una hebra de ADN sobre la otra durante la replicación.

Los MIRUS están compuestos por dos secuencias de motivos consenso que se identificaron por primera vez en el genoma de *M. tuberculosis* (Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998; Bull y col. 2003), denominadas A (de 24 pb) TGACGAGGAGCGGCGCAGATGGCA y B (de 29 pb) GGCGCCGGTGACGATGCAGAGCGTAGCGA. La búsqueda de estos motivos en los genomas de *M. a. avium* y *M. a. paratuberculosis* reveló un total de 31 motivos A y 24 motivos B en el genoma del primero y 26 motivos A y 20 motivos B en el genoma del segundo. En ambos genomas, estos motivos se encontraron agrupados en 18 loci y la secuencia de los primeros 500 pb de la región adyacente a éstos presentaba entre un 96 y un 100% de homología entre ambos genomas. El denominado MIRU-7 no se encontró presente en el genoma de *M. a. avium* pero por otro lado la distribución de los motivos de los loci comprendidos entre el MIRU-8 y el MIRU-18 fue idéntica en ambos genomas. Únicamente los MIRU loci del 1 al 6 presentaron diferencias entre los miembros de MAC (Figura 10).

Figura 10. Diagrama que representa la distribución de motivos A y B en cada uno de los MIRU loci. En los motivos A, el sufijo “a” indica el motivo MIRU primario, el sufijo “b” indica el motivo terminal y sufijo “i” indica el motivo MIRU interno. En el caso de MIRU locus 5 el motivo B en *M. a. avium* presenta un SNP que está indicado con el sufijo “b”. En todos los casos la dirección de transcripción es de izquierda a derecha y está determinado por el ORF inmediatamente adyacente (Bull y col. 2003).



A su vez, cada una de las secuencias de los motivos primarios, internos y terminales es única, de manera que las diferencias entre los motivos A dentro de cada locus son mayores que las diferencias dentro de cada motivo, lo que sugiere que las repeticiones MIRU se producen por un mecanismo replicativo único para cada locus individual. Por el contrario, en el caso de los motivos B éstos se encuentran conservados al 100% dentro de cada uno de los locus.

En cuanto a la transcripción de los MIRU, en el caso de los motivos A, éstos presentan un codon de iniciación ATGA o GTGA, situado a 8 ó 9 pb en la dirección 5'-3' (o *downstream*) a un sitio de unión ribosomal (RBS), el cual presentaba la secuencia consenso 5' TGA GGA GGA 3'. A su vez, todos los MIRU acaban en un motivo A, cuyo RBS y codon de iniciación están orientados de manera que actúan como un hipotético sitio de iniciación de transcripción para el ORF inmediatamente adyacente en posición 5' (Figura 11) (Bull y col. 2003; Romano y col. 2005). El análisis de la predicción de ORFs en los MIRU loci del 1 al 6 puso de manifiesto que la configuración de motivos A-B-A codificaba para un péptido de 18 aminoácidos (MTRADDDAERSDEEERRR). Cada configuración A-B-A contenía además su propio RBS y codon de iniciación en el primer motivo A y un codon de terminación para cada segundo motivo A. De estos seis MIRU loci anteriormente descritos, únicamente los MIRU del 1 al 4 han sido empleados para la caracterización de aislados miembros de MAC, de los cuales MIRU-1 y 4 únicamente distinguieron entre los miembros de MAC (*M. a. paratuberculosis* de *M. a. avium*, *M. a. silvaticum* y *M. intracellulare*) pero no presentaron variabilidad intra-especie (Bull y col. 2003), aunque un aislado de *M. a. paratuberculosis* de Alemania presentó dos variantes alélicas en el MIRU-1 (Möbius y col. 2008).

Además de estos MIRU, Romano y colaboradores (Romano y col. 2005) describieron cinco MIRU loci adicionales, de los cuales únicamente emplearon tres en un panel de 26 aislados de *M. a. paratuberculosis* y 21 aislados de *M. a. hominissuis*. Los MIRU loci empleados fueron designados MIRU-4 (localizado entre los genes MAP3973c y MAP3974c), MIRU-6 (MAP1837c y MAP1838) y MIRU-7 (MAP1374c y MAP1375c), habiendo estos dos últimos sido descritos previamente por Overduin y colaboradores (Overduin y col. 2004) (VNTR-1605 y VNTR-3527, respectivamente) (Tabla 5). Sin embargo, ninguno de los MIRUs empleados en este estudio fue capaz de discriminar entre los aislados de *M. a. paratuberculosis* obtenidos de Sudamérica (Romano y col. 2005).

Figura 11. Adaptación de la figura que muestra el alineamiento de todas las secuencias individuales de los motivos A y B de los 18 MIRU loci descritos en los genomas de *M. a. avium* y *M. a. paratuberculosis*. También están indicadas las secuencias consenso de los motivos A y B, con el RBS y los codon de iniciación y terminación (Bull y col. 2003).

6. Elementos repetitivos

(a) MIRU Motivo A				MIRU Motivo B			
TERMINACIÓN RBS	COMIENZO/TERMINACIÓN			COMIENZO			
TGA <u>CGAGGA</u> GCGGCGCAGATGAAT	-	Consenso		CGCGCCGACGACGATGCGAGCGCAGCGA	-	Consenso	
GAC.....A.....	-	A1a	MIRU1G.....	-	B1	MIRU1
G.....A.....	-	A1a2					
.....A.....	-	A1b					
G..T.....C..CT..AG...CA	-	A2a	MIRU2		-	B2	MIRU2
.....CA	-	A2b					
.....C	-	A2i					
A....A..A.TAC..C....C	-	A3a	MIRU3GT..T.....T....	-	B3	MIRU3
.....ATC....C....CC	-	A3b					
.....ATC....C....C	-	A3i					
.....TC	-	A4a	MIRU4G..G.....T....	-	B4	MIRU4
.....T	-	A4b					
CC.C.....C.....G	-	A5a	MIRU5	COMIENZO			
GT.C.....A.....G	-	A5b		AC.....A.G..CCG..TTGCCCATGGGCAAGCCGG	-	B5a	MIRU5
GT.C.....C.....G	-	A5i		AC.....A.G..CCG..TTGCCCTATGGGCAAGCCGG	-	B5b	
.....G.G..T	-	A6a	MIRU6	TC.....G.....	-	B6	MIRU6
.....-G..G	-	A6b					
.....AG..G	-	A6c					
.....GA.GTG.A..C.TG	-	A7b	MIRU7	TC.A..AC.....A....	-	B7	MIRU7
.....CC	-	A8b	MIRU8	GC.CAT...C.....A....	-	B8a	MIRU8
..G.....C.....A	-	A9b	MIRU9	AC.....A.....	-	B8b	
.....T....CC....GC	-	A10b	MIRU10 en MAA	..C.....T....	-	B9	MIRU9
.....AC....G	-	A10b2	(en MAP)G.....	-	B10a	MIRU10 en MAA
.....T....ATATG..	-	A11b	MIRU11G.....	-	B11	MIRU11 & MIRU 13
..CT.....CCGAC..C	-	A12b	MIRU12G.....A....	-	B12	MIRU12 & MIRU 10 en MAP
..CT.....CC	-	A13b	MIRU13 en MAA				
..CT.....C	-	A13b2	(en MAP)				
...A...T....CTGAATGA	-	A14b	MIRU14	GCGCG.C.....G....	-	B14	MIRU14
.....CA...CATG.GTG	-	A15b	MIRU15A.....CA....	-	B15	MIRU15
.....CA....G	-	A16b	MIRU16	TCGCG.CG.A.....A....	-	B16	MIRU16
..G.....C....CC	-	A17b	MIRU17	T.....G.....A.G....	-	B17	MIRU17
.....GC.GAATA..C.TC	-	A18b	MIRU18 en MAA	TC.A...C.....	-	B18	MIRU18
.....GC.GAATA..CGTC	-	A18b2	(en MAP)				

De los MIRUs descritos, el denominado MIRU-3 en MAC se corresponde con el MIRU locus designado *senX3-regX3* en *M. tuberculosis* (Supply y col. 1997; Magdalena y col. 1998). En *M. tuberculosis*, este locus presenta una secuencia de 77 pb, la cual se corresponde con un motivo A de 24 pb, con un 84% de homología con el motivo A consenso para los miembros de MAC y un motivo B de 53 pb. Éste último está a su vez compuesto por un motivo B1 de 29 pb, con un 93% de homología con el motivo B consenso en los miembros de MAC y un motivo adicional B2 de 24 pb, que no presenta homología alguna con los motivos B1 o A de los miembros de MAC descrito por Bull y colaboradores (Bull y col. 2003). Además, el motivo terminal de este locus posee una estructura B1-A, presente también en MAC. En todas las cepas de *M. bovis* BCG este motivo terminal de 53 pb B-A está ausente, con lo que se ha descrito que un mayor número de repeticiones en este locus MIRU puede dar lugar a un incremento de la expresión del péptido consenso, lo que puede afectar a su vez a la expresión de los genes situados en posición 5', ya que su RBS y codon de iniciación se encuentran en su motivo terminal A (Bull y col. 2003; Romano y col. 2005). Al igual que en el caso de la cepa vacunal *M. bovis* BCG (Magdalena y col. 1998), el mismo hallazgo se ha encontrado en la cepa vacunal de *M. a. paratuberculosis* 316F (Bull y col. 2003).

Esta técnica molecular rápida basada en el análisis de los polimorfismos en cuanto al número de repeticiones en los MIRU loci ha sido empleada en la subtipificación de los aislados de *M. a. paratuberculosis*, además de otros miembros de MAC. Se ha empleado en países como Reino Unido (Bull y col. 2003), Sudamérica (Romano y col. 2005), Alemania (Möbius y col. 2008; Möbius y col. 2009), Francia (Thibault y col. 2007; Thibault y col. 2008), y Japón (Inagaki y col. 2009).

7. Técnicas de caracterización molecular en *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

7.1. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*Restriction fragment lenght polymorphisms*, RFLP)

El análisis de los polimorfismos de longitud tras la restricción enzimática de ADN genómico y su posterior hibridación con sondas específicas de la secuencia de inserción IS900 (IS900-RFLP) ha sido el método de tipificación molecular tradicional más empleado en *M. a. paratuberculosis*.

Entre los primeros trabajos que describen el empleo del IS900-RFLP destaca el realizado por Collins y colaboradores (Collins y col. 1990). En el mismo, emplearon la enzima de restricción *Bst*EII y realizaron el análisis de 29 aislados de *M. a. paratuberculosis* obtenidos de ovejas, vacas y una cabra de Canadá, Islas Faroe, Australia, Nueva Zelanda y cepas de referencia de Reino Unido (cepa vacunal 316F) y de Estados Unidos (ATCC43015 y TMC1613). En este estudio se describió por primera vez la existencia de tres grupos de aislados de *M. a. paratuberculosis* a los que se denominó grupo bovino, ovino e intermedio (cuyo perfil de restricción estaba más próximo al de tipo ovino que al de tipo bovino). Los grupos se denominaron I o perfil de hibridación de tipo C (formado por 19 aislados bovinos, seis ovinos y nueve caprinos), grupo II o perfil de hibridación de tipo S (incluyó nueve cepas de aislados ovinos y caprinos) y un aislado ovino canadiense que dio lugar a un perfil intermedio. Posteriormente, en otro estudio se incluyeron 34 aislados de *M. a. paratuberculosis* de ovejas, vacas y cabras obtenidos de Estados Unidos, Canadá y Argentina, y se emplearon cuatro enzimas de restricción (*Bcl*I, *Bst*EII, *Pst*I y *Pvu*II). En este trabajo se encontraron ocho patrones de restricción diferentes, pero no hubo una clara asociación entre los hospedadores

y la clasificación obtenida tras la aplicación de esta técnica (Whipple y col. 1990). En otro estudio, la aplicación del IS900-RFLP en cinco aislados de *M. a. paratuberculosis* de ovejas obtenidas de Sudáfrica agrupó a todos los aislados dentro del perfil intermedio (de Lisle y col. 1992).

Esta técnica fue aplicada en 1993 de nuevo (de Lisle y col. 1993) en 20 aislados de ciervos de Nueva Zelanda, de los cuales tres mostraron el mismo perfil de RFLP que el tipo S, más comúnmente observado en los aislados ovinos de Nueva Zelanda, mientras que el resto mostraron el mismo perfil que los aislados bovinos del tipo C, ambos previamente descritos (Collins y col. 1990). Más adelante, 31 aislados de *M. a. paratuberculosis* (16 aislados de cabras de Noruega, cinco de vacas y dos de ciervos de Dinamarca, una oveja de Grecia y dos ciervos de las Islas Faroe) y cepas de referencia fueron sometidas a esta técnica mediante el empleo de la enzima de restricción *PvuII*. Este estudio resultó en cinco perfiles de restricción diferentes en 25 de los 31 aislados de *M. a. paratuberculosis* analizados, mientras que seis de los aislados caprinos de Noruega no hibridaron con la sonda IS900. De los aislados que dieron perfiles interpretables, cuatro fueron muy similares entre sí, exceptuando el quinto perfil obtenido de un aislado ovino de las Islas Faroe, el cual fue más divergente y similar al perfil intermedio (Thoresen y Olsaker, 1994).

En otro estudio posterior se incluyeron 89 aislados de *M. a. paratuberculosis* de rumiantes y un aislado humano obtenidos de diferentes localizaciones que fueron analizados con la enzima *PstI*. A los perfiles de RFLP resultantes se les denominó A, B y C respectivamente, dentro de cada uno se incluyeron 37, 51 y 2 aislados respectivamente. De todos los aislados incluidos, únicamente los aislados bovinos presentaron los tres tipos de perfiles de RFLP observados (A, B y C), mientras que el único aislado caprino incluido en el estudio se correspondió con el tipo C y el aislado humano al tipo B. De los 89 aislados anteriores 32 se analizaron además con la enzima de restricción *BstEII* (14 aislados representantes del tipo A obtenido con la enzima de restricción *PstI* y 18 al tipo B), de los que todos los aislados del tipo A se clasificaron dentro del tipo C previamente descrito (Collins y col. 1990) y los del tipo B dentro del que denominaron tipo C_x (Pavlik y col. 1995).

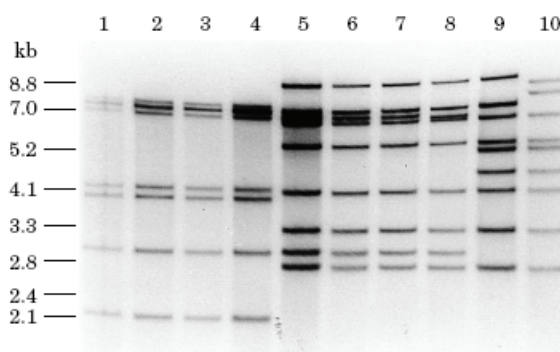
En otro trabajo examinaron los perfiles de 93 aislados de *M. a. paratuberculosis* (26 aislados ovinos de Marruecos y dos de Sudáfrica, siete aislados caprinos de Alemania, un aislado bovino de Marruecos, nueve aislados bovinos de Alemania y uno bovino de Estados Unidos) con la enzima de restricción *PvuII*. El análisis de restricción enzimática reveló cinco perfiles de restricción diferentes, los cuales denominaron 1, 2, 3, 4 y 5. De éstos los perfiles 1,

2 y 3 se encontraron exclusivamente en aislados de *M. a. paratuberculosis* de ovejas (aislados de crecimiento lento y al que denominaron grupo o *cluster*

I), mientras que los perfiles 4 y 5 fueron hallados en aislados de vacas y cabras (crecimiento rápido, grupo o *cluster* II). Por lo que concluyeron, al igual que en los trabajos previos, que había dos linajes o grupos diferentes en los que se daba una preferencia de hospedador (Bauerfeind y col. 1996).

Más adelante, Collins y colaboradores (Collins y col. 1997) estudiaron los patrones de restricción obtenidos con la enzima *Bst*EII, que hibridaron posteriormente con la secuencia de inserción *IS1311* en 10 aislados de *M. a. paratuberculosis* procedentes de Nueva Zelanda (un aislado de vaca, uno de oveja y uno de ciervo), de las Islas Faroe (un aislado de oveja), Sudáfrica (un aislado de oveja) y de Islandia (un aislado de oveja) junto con una cepa de referencia procedente de Estados Unidos (aislado de vaca), y se compararon con 62 aislados de MAC distintos de *M. a. paratuberculosis*. A pesar de que los resultados de RFLP e hibridación con *IS1311* mostraron los mismos resultados que la hibridación con *IS900* y los aislados de *M. a. paratuberculosis* se dividieron en tres grupos diferentes (Figura 12), la presencia de *IS1311* en los otros miembros de MAC hace que el *IS900*-RFLP constituya la técnica de elección para la caracterización de los aislados de *M. a. paratuberculosis*.

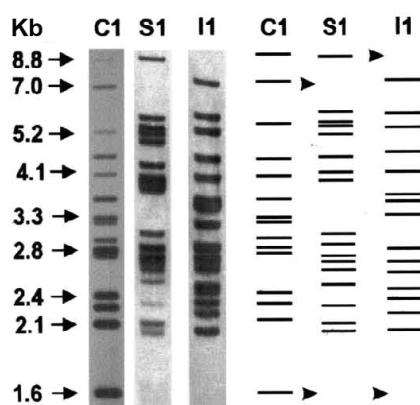
Figura 12. Adaptación de los resultados de RFLP obtenidos con la enzima *Bst*EII e hibridación con la *IS1311* en los aislados de *M. a. paratuberculosis*. Las líneas de la 1 a la 4 representan el tipo C descrito anteriormente (cepa de referencia, dos aislados bovinos y uno de ciervo de Nueva Zelanda). Los aislados representados en las líneas 5-8 se corresponden con los aislados del tipo S (aislado de ciervo, dos aislados ovinos de Nueva Zelanda y un aislado ovino de las Islas Faroe). Las líneas 9-10 con los aislados del tipo intermedio (un aislado ovino de Sudáfrica y uno de Islandia) (Collins y col. 1997).



En un trabajo posterior, Choy y colaboradores (Choy y col. 1998) describieron la presencia del tipo S1 descrito por Collins (Collins y col. 1990) en el raspado de la mucosa intestinal de cinco aislados de *M. a. paratuberculosis* obtenidos de ovejas australianas mediante el empleo de la enzima de restricción *Bst*EII, que a su vez compararon con cinco aislados bovinos obtenidos de Escocia y la cepa referencia 316F, los cuales presentaron patrones de restricción C3 y C1, respectivamente según la descripción original de Collins y colaboradores. Seguidamente, la caracterización molecular mediante el empleo de esta técnica de IS900-RFLP en 11 aislados de *M. a. paratuberculosis* obtenidos de conejos salvajes y 4 aislados vacunos con las enzimas de restricción *Pst*I y *Bst*EII revelaron que todos los aislados excepto un aislado de conejo salvaje (el cual presentó el perfil C16) presentaron el perfil C17, perfil ampliamente distribuido en aislados escoceses de vacas y ovejas en Reino Unido (Greig y col. 1999).

En 1999, Pavlik y colaboradores propusieron la estandarización de la técnica IS900-RFLP con las enzimas de restricción *Pst*I y *Bst*EII (Pavlik y col. 1999). En este trabajo se realizó la caracterización molecular de 1008 aislados de *M. a. paratuberculosis* de una amplia diversidad geográfica y rango de hospedador. La restricción enzimática con la enzima *Pst*I dio lugar a 13 perfiles, los cuales fueron designados de la A a la M. Los perfiles de la A-D ya habían sido anteriormente descritos (Pavlik y col. 1995). Por otro lado, la digestión enzimática con la enzima *Bst*EII dio lugar a tres grupos diferentes, designados C, S e I, subdividiéndose estos a su vez en siete (C1-C7), en tres [S1-S2 y S3, (de Lisle y col. 1993)] y en dos (I1-I2), respectivamente (Figura 13), confirmándose lo descrito anteriormente por Collins y colaboradores (Collins y col. 1990).

Figura 13. Adaptación de la publicación original (Pavlik y col. 1999) en la que se muestran los tres perfiles de restricción obtenidos con la enzima *Bst*EII, C, S e I de la publicación original. Los perfiles se muestran tras procesar los datos con el software Gel Comprar (Collins y col. 1990).



Sin embargo, según describen los propios autores, esta técnica de IS900-RFLP es difícilmente aplicable sobre aquellos aislados que presentan un crecimiento más lento (como es el caso de las cepas ovinas o I y las intermedias o tipo III). Por ello, dentro de este trabajo en que se estandarizó esta técnica para la caracterización de *M. a. paratuberculosis* y en el que se incluyeron todos los aislados de crecimiento lento obtenidos durante un período de 10 años, esta técnica tan sólo fue aplicable en 10 de los 20 aislados (Pavlik y col. 1999). Así mismo, esta técnica se empleó en la caracterización molecular de 61 aislados de *M. a. paratuberculosis* de vacas y ciervos obtenidos de Argentina mediante la restricción del ADN genómico con la enzima *BstEII*, técnica que dio lugar a cuatro perfiles que denominaron A, B, C y E. De estos patrones de restricción el A [el cual se corresponde con el patrón C17 descrito anteriormente (Pavlik y col. 1999)] fue el más representado entre los aislados analizados e incluyó a todos los aislados de ciervo, mientras que los procedentes de vacas estuvieron distribuidos entre los cuatro perfiles. Como se ha citado anteriormente, este perfil también se observó con gran prevalencia en los aislados de conejo salvaje, vacuno y ovino de Reino Unido (Greig y col. 1999) y representó un 3,7% de la totalidad de aislados europeos analizados en otra publicación (Moreira y col. 1999). Esta misma técnica también se aplicó en 71 aislados de *M. a. paratuberculosis* obtenidos de diferentes estados australianos y se compararon con cuatro cepas de referencia, un aislado de un paciente de Crohn, dos aislados vacunos de Nueva Zelanda del tipo C1, dos aislados ovinos de Nueva Zelanda del tipo S1 y dos aislados ovinos de Sudáfrica del tipo intermedio (I) (Cousins y col. 2000). En este trabajo describieron el análisis de restricción de 13 aislados con siete enzimas de restricción (*BstEII*, *PvuII*, *PstI*, *BamHI*, *AluI*, *XhoI* y *DraI*), empleándose, únicamente *BstEII*, *PvuII*, *PstI* y *BamHI* en el análisis de la totalidad de los aislados. La digestión genómica con estas cuatro últimas enzimas reveló 11, 6, 4 y 12 perfiles de restricción diferentes respectivamente. La combinación de las cuatro enzimas dio lugar a un total de 14 perfiles de RFLP, siendo la enzima *BamHI* la más efectiva para la identificación de polimorfismos en los aislados analizados y sin embargo *PvuII* la de menor poder de discriminación, es la enzima de restricción estandarizada previamente.

Por otro lado, en otro trabajo se analizaron 300 aislados de *M. a. paratuberculosis* australianos mediante IS900-RFLP con la enzima de restricción *BstEII*, enzima que dividió a los aislados en 12 perfiles diferentes (cinco y siete perfiles específicos para los aislados ovinos

y bovinos respectivamente), de los cuales cinco habían sido previamente descritos y seis fueron noveles (Whittington y col. 2000). Esta técnica también se empleó en un panel de 81 aislados de *M. a. paratuberculosis* procedentes de 10 países y de diferentes especies animales (vacas, cabras, ovejas y hombre). Tras el empleo de las enzimas de restricción *BstEII* y *PstI* se obtuvieron 17 perfiles de restricción (Bull y col. 2000). Tras estos estudios iniciales, esta técnica ha sido empleada en aislados de *M. a. paratuberculosis* de la República Checa obtenidos de animales salvajes (Pavlik y col. 2000; Machackova y col. 2004; Machackova-Kopečna y col. 2005), aislados de ovejas, vacas y conejo salvaje en Reino Unido e Islas Faroe (Stevenson y col. 2002), aislados de cabras de España (de Juan y col. 2005), aislados de cabras de Noruega (Djonne y col. 2005) y dos aislados obtenidos de osos de Eslovaquia (Kopečna y col. 2006). La presencia de los tres tipos de cepas de *M. a. paratuberculosis* descritas inicialmente por Collins y colaboradores (Collins y col. 1990) ha sido corroborada tras la descripción reciente de perfiles de IS900-RFLP intermedios en cabras procedente de Alemania (Möbius y col. 2009). Actualmente esta técnica se ha empleado para la caracterización molecular de 164 aislados de *M. a. paratuberculosis* procedentes de siete países europeos y representantes de 19 especies animales diferentes. De los aislados analizados, sólo 93 fueron caracterizados con la enzima *PstI*, dividiéndose en seis perfiles diferentes. En el caso de la enzima *BstEII*, los 142 aislados caracterizados se dividieron en 17 perfiles diferenciados. La combinación con ambas enzimas, sólo posible en 88 aislados, dio lugar a diez perfiles (Stevenson y col. 2009).

A su vez, esta técnica molecular tradicional se ha comparado con la de los MIRU-VNTR, técnicas de tipificación molecular rápidas (ver páginas 31-39). Así, en un estudio inicial se describió el poder de resolución de la técnica de VNTR, herramienta capaz de subdividir los perfiles de RFLP más comunes, con una mayor discriminación que la obtenida con la técnica de IS900-RFLP (de 0,448 en comparación con 0,316 obtenido mediante IS900-RFLP) (Overduin y col. 2004). Por el contrario, en otro artículo se describió el análisis de los perfiles de IS900-RFLP y MIRU-VNTR en 26 aislados de *M. a. paratuberculosis* de Argentina. En éste observaron que los cinco perfiles de restricción en los que se diferenciaron los aislados no pudieron ser subdivididos mediante la técnica de MIRU-VNTR, mostrando para todos los aislados el mismo perfil de MIRU-VNTR (Romano y col. 2005). Más recientemente y con la descripción de nuevos loci MIRU-VNTR, el poder de discriminación de esta técnica molecular rápida se ha comparado con el del IS900-RFLP en 183 aislados de *M. a. paratuberculosis*, observándose que la primera presentaba un valor de

0,751 y la segunda técnica de 0,483. Sin embargo, los autores recalcan que con la combinación de ambos métodos se obtuvo un poder de discriminación aún mayor, de 0,855 (Thibault y col. 2007).

A continuación, la aplicación de esta técnica en 71 aislados vacunos de Alemania determinó que no existía una asociación entre los perfiles de IS900-RFLP y los obtenidos mediante el empleo de loci MIRU-VNTR, por tanto recomendaron el empleo de ambas técnicas conjuntamente para poder entender la epidemiología de la paratuberculosis (Möbius y col. 2008).

La principal desventaja de la técnica de IS900-RFLP es que es laboriosa y difícil de aplicar en aislados de crecimiento lento y por lo tanto ha sido sugerida por algunos autores como herramienta para una posterior discriminación de los aislados que se encuadren dentro de un mismo perfil alélico de MIRU-VNTR (Thibault y col. 2008).

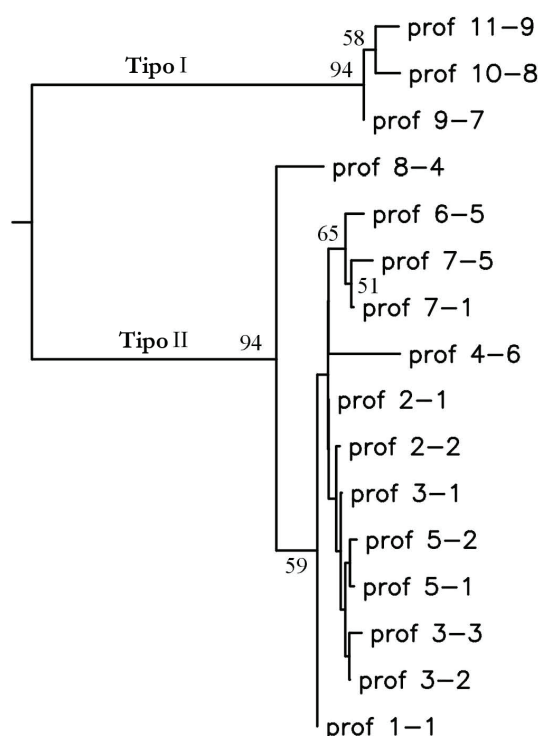
Por lo tanto, se podría concluir que a pesar de la capacidad discriminativa de la técnica de IS900-RFLP, las dificultades técnicas por un lado, la dificultad de aplicarla de para la tipificación de ciertos aislados de *M. a. paratuberculosis* por otro, así como la restringida diversidad genética obtenida especialmente con los aislados del tipo I (ovino) y III (intermedio) hace que las nuevas técnicas genómicas rápidas como MIRU-VNTR, SSR, entre otras sean las técnicas de elección actual (ver apartados 6.2-6.4).

7.2. Electroforesis en campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE)

La técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE) es una técnica molecular tradicional que se basa en la extracción de todo el ADN genómico del aislado a analizar mediante la ruptura de la pared celular de la misma en el interior de un bloque de agarosa, y la posterior digestión del ADN genómico mediante enzimas de restricción específicas. A continuación los fragmentos obtenidos tras la digestión enzimática son separados en un gel de agarosa el cual se somete a pulsos eléctricos alternos, tanto en tiempo como en dirección. Esta técnica fue aplicada por primera vez en la tipificación genómica de *M. a. paratuberculosis* de 35 aislados de origen australiano y se compararon con una cepa de referencia aislada en Reino Unido. Como resultado, los aislados de *M. a. paratuberculosis* australianos fueron divididos en dos grupos y diferenciados de la cepa de Reino Unido; viéndose perfiles genéticos comunes entre aislados de vacas y de alpacas por un lado y otros compartidos entre aislados de vacas, una oveja y una cabra (Feizabadi y col. 1997).

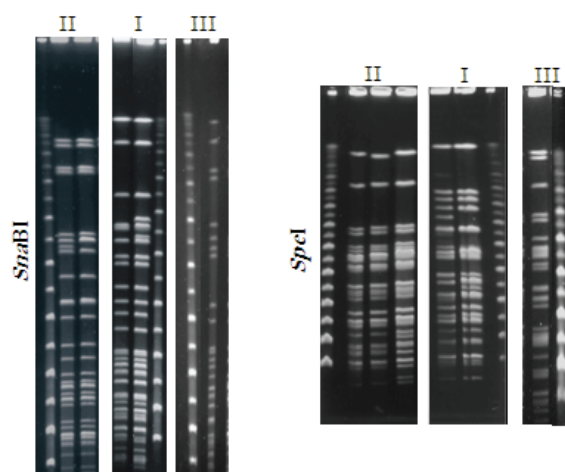
Más adelante, esta técnica se empleó para la caracterización molecular de aislados de *M. a. paratuberculosis* que habían sido previamente divididos en aislados de tipo pigmentado (entre los que se comprendieron todos los aislados que presentaron el perfil de tipo ovino o S de acuerdo a la PCR-REA de IS1311) y del tipo no pigmentado. La restricción enzimática de los genomas de las cepas incluidas en el estudio (88 cepas de *M. a. paratuberculosis* no pigmentadas y cinco ovinas pigmentadas) se llevó a cabo con las enzimas *Sna*BI y *Spe*I, las cuales dieron lugar a 16 perfiles genómicos diferentes, siendo el perfil de las cepas ovinas pigmentadas único y distinto del resto (Stevenson y col. 2002) (Figura 14). En este estudio también se compararon los resultados de PFGE con los obtenidos mediante IS900-RFLP con las enzimas *Bst*EII y *Pvu*II, esta última técnica fue únicamente capaz de diferenciar los 93 aislados en seis genotipos diferentes, dando con ello lugar a un menor índice de discriminación.

Figura 14. Adaptación del dendrograma generado a partir de los 16 perfiles genómicos obtenidos con la técnica de PFGE de los aislados de *M. a. paratuberculosis* pigmentados y no pigmentados (Stevenson y col. 2002).



cuales fueron digeridos con las enzimas de restricción *Sna*BI y *Spe*I. Los resultados fueron finalmente comparados con los obtenidos mediante la técnica de IS900-RFLP tras el empleo de las enzimas *Bst*EII y *Pvu*II. En este caso, la técnica de PFGE clasificó los aislados de *M. a. paratuberculosis* en 13 perfiles diferentes tras la combinación de ambas enzimas de restricción, resultando en 10 perfiles noveles. El análisis filogenético de los perfiles de PFGE corroboró las existencia de los mismos tres grupos o *clusters* descritos mediante la técnica de IS900-RFLP. Sin embargo a estos grupos se les denominó por vez primera tipo I (al tipo ovino o S), II (al tipo bovino o C) y III (al intermedio o I), dado que no encontraron relación alguna entre hospedador y tipo de cepa de *M. a. paratuberculosis* (Figura 15) (Tabla 5).

Figura 15. Representación de los perfiles de PFGE obtenidos con las enzimas de restricción *Sna*BI y *Spe*I en el que se subdividen por primera vez las cepas de *M. a. paratuberculosis* en los tipos I, II y III (de Juan y col. 2005).



Por lo general, las cepas de tipo I presentan un crecimiento más lento así como una fuerte preferencia de hospedador (las ovejas). Sin embargo, las cepas de tipo II o bovinas son cepas que se incluyen dentro de las cepas de crecimiento más rápido y que han sido aisladas en un amplio rango de hospedadores. Por último, las cepas de *M. a. paratuberculosis* de tipo III o intermedia, están fenotípicamente más próximas a las cepas de tipo I ya que presentan un crecimiento lento pero sin embargo presentan un rango de hospedadores más amplio que éstas (de Juan y col. 2005).

Esta técnica de PFGE ha sido empleada en la caracterización molecular de 520 aislados de *M. a. paratuberculosis* de España (Sevilla y col. 2007). En este estudio, la combinación de las enzimas de restricción *Sna*BI y *Spe*I dio lugar a un total de 37 perfiles

diferentes, los cuales denominaron pulsotipos. De éstos, 32 representaron pulsotipos o perfiles no descritos anteriormente y el índice de discriminación genética obtenida en el estudio fue de 0,693.

Recientemente, la técnica de PFGE se ha empleado en la caracterización molecular de 145 aislados de *M. a. paratuberculosis*. Las enzimas de restricción *Sna*BI y *Spe*I permitieron la división de los aislados en 24 y 23 grupos diferentes, respectivamente. La combinación de ambas enzimas permitió la diferenciación de 31 grupos diferentes (Stevenson y col. 2009).

La principal desventaja de esta técnica, como los mismos autores sostienen (Sevilla y col. 2007), es que presenta un alto coste y además no es aplicable en aquellos aislados de *M. a. paratuberculosis* que no presentan crecimiento suficiente. Finalmente, concluyen que a pesar de ser una técnica de gran poder de resolución, la información genética proporcionada por la misma no parece relacionada con las características fenotípicas de las cepas.

Tabla 5. Clasificación de las cepas de *M. a. paratuberculosis* en función de diferentes técnicas de caracterización molecular.

IS900-RFLP ¹	IS1311 PCR-REA ²	PFGE ³	RDA-PCR ⁴
Bovino (C)	Bovino, Bisonte (C, B)	Tipo II	Tipo II
Ovino (S)	Ovino (S)	Tipo I	Tipo I
Intermedio (I)		Tipo III	

¹ Clasificación inicial descrita por Collins y colaboradores 1990.

² Clasificación según Whittington y colaboradores 2001.

³ Descripción original de Stevenson y colaboradores 2002.

⁴ Clasificación según el trabajo publicado por Dohmann y colaboradores 2003.

7.3. Análisis de las diferencias representacionales (*Representational differential analysis*, RDA)

Esta técnica se emplea para la comparación de dos genomas, los cuales se amplifican mediante PCR y a continuación las diferencias entre ambos se analizan mediante la técnica de hibridación sustractiva del ADN.

Esta herramienta molecular se emplea en el caso de genomas similares, en los cuales uno de los ADN actúa como conductor o *driver* y otro como problema o *tester*. Ambos genomas se mezclan y se someten a una restricción enzimática, encontrándose el ADN conductor en una mayor proporción que el problema, a continuación se desnaturalizan y

finalmente se hibridan. Durante el proceso de hibridación todas las regiones que son similares en los genomas del ADN conductor se unen a las regiones homólogas del ADN problema, bloqueando así la reacción de amplificación por PCR de los fragmentos que son homólogos, pero no así la de las regiones no homólogas (Lisitsyn y col. 1993). En lo que respecta a *M. a. paratuberculosis*, esta técnica se aplicó en dos cepas del tipo I y II, lo que permitió la identificación de tres regiones genómicas específicas para las cepas del tipo I, que se denominaron pig-RDA10 (de 233 pb de longitud), pig-RDA20 (197 pb) y pig-RDA30 (548 pb). Seguidamente se desarrolló una técnica de PCR dirigida a estas regiones o fragmentos del genoma que resultó en una amplificación positiva únicamente en el caso de las cepas de *M. a. paratuberculosis* del tipo I pero no en las cepas del tipo II incluidas en el estudio. En este mismo trabajo también se analizaron los genomas de *M. a. paratuberculosis* (ADN problema) y de *M. a. avium* (ADN conductor), encontrándose fragmentos del genoma específicos para *M. a. paratuberculosis*, ausentes en el genoma de *M. a. avium* y a los cuales se les denominó RDAI30 (631 bp), RDAII60 (652 pb) y RDAIII110 (456 pb) (Dohmann y col. 2003). Esta técnica se empleó de nuevo en dos aislados de *M. a. paratuberculosis*, uno del tipo bovino (ADN problema) y otro del tipo ovino (ADN conductor). Como resultado se obtuvieron tres regiones genómicas específicas del genoma de la cepa de tipo bovino a las que se les denominó regiones RDA1 (229 pb), RDA3 (206 pb) y RDA4 (163 pb). De estas delecciones, RDA4 resultó ser un artefacto, RDA1 únicamente presentó una diferencia de una base entre ambas cepas y tan sólo RDA3 (genes MAP1734-MAP1743c) resultó ser una delección real en las cepas del tipo ovino (Marsh y Whittington, 2005).

7.4. Análisis de polimorfismos de fragmentos largos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP*)

Esta técnica está basada en la combinación de RFLP y PCR para dar lugar a una amplificación de los productos originados tras la restricción enzimática del ADN genómico. La principal ventaja de esta técnica reside en la escasa cantidad de ADN genómico requerido.

Inicialmente se empleó esta técnica de AFLP en la tipificación de 86 aislados de *M. a. paratuberculosis* y 16 aislados miembros de MAC. El resultado de esta técnica mostró que el 72% de los aislados de *M. a. paratuberculosis* analizados se agruparon en tan sólo dos grupos o *clusters* mayoritarios, indicando la poca resolución de esta técnica aplicada en la subtipificación molecular de *M. a. paratuberculosis*. Sin embargo, en este mismo estudio los aislados de origen

humano fueron agrupados en un grupo independiente y diferente de los dos anteriores (Motiwala y col. 2003). Posteriormente, esta técnica se empleó en la subtipificación molecular de 20 aislados de *M. a. paratuberculosis*, entre los cuales se observó una mayor heterogeneidad genética a la descrita anteriormente con esta técnica, revelándose hasta un total de 11 genotipos diferentes (O'Shea y col. 2004). Otro trabajo en el que se analizaron 56 aislados de *M. a. paratuberculosis* obtenidos de cultivos fecales originó 11 perfiles, confirmando también la presencia de una heterogeneidad genética mayor a la descrita inicialmente (Kiehnbaum y col. 2005).

En un estudio reciente, en el que se analizaron 68 aislados de *M. a. paratuberculosis* procedentes de siete países europeos, los patrones de restricción generados con las enzimas *EcoRI* y *MseI* fueron similares entre ellos (con una homología entre el 90 y el 95%) y diferentes al resto de micobacterias (Stevenson y col. 2009).

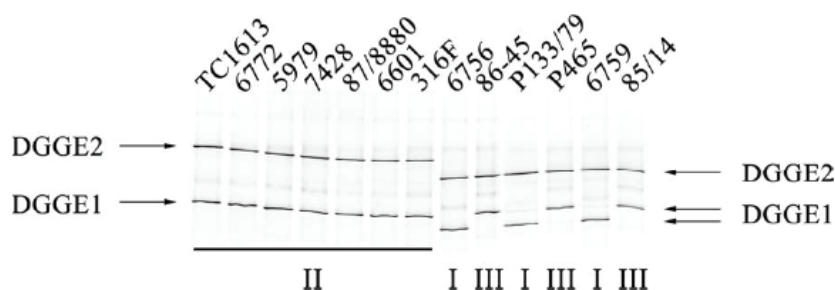
La principal desventaja, como los propios autores afirman (Kiehnbaum y col. 2005) es que la estandarización de la técnica entre laboratorios puede ser difícil, además para asegurar la reproducibilidad de los resultados cada reacción debe hacerse en duplicado (Kiehnbaum y col. 2005) e incluso a veces hasta ocho veces (O'Shea y col. 2004). Por lo tanto, la aplicación de esta técnica con fines epidemiológicos es reducida dada las limitaciones de la misma (Amonsín y col. 2004).

7.5. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (*Denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE)

La técnica de DGGE se basa en la amplificación por PCR de la región polimórfica de un gen, empleando para ello una abrazadera o *clamp* de 40 pb rica en contenido GC. Posteriormente, los productos amplificados por PCR se separan mediante un gel de poliacrilamida al 8% el cual contiene dos sustancias desnaturizantes, la urea y la formamida. Este método de DGGE sirve para separar y diferenciar los SNPs que se encuentran presentes en la región del gen amplificado por PCR, empleando para ello productos desnaturizantes. La técnica de DGGE ha sido empleada en estudios de diversidad genética en poblaciones microbianas (Leys y col. 2005; García-Moyano y col. 2007; Zwielehner y col. 2008) y para el análisis de mutaciones en el caso de los miembros del género *Mycobacterium* (Scarpellini y col. 1999; Scarpellini y col. 2003; McCammon y col. 2005).

En *M. a. paratuberculosis* esta técnica se empleó para la discriminación de los tipos I, II y III, empleando para ello los SNPs presentes en el gen MAP1506 (en las posiciones 293, 328, 344, 411, 542, 944-946), miembro de la familia PE/PPE (ver en el apartado 4.2 para la definición de las proteínas PE/PPE) (Griffiths y col. 2008) (Figura 16).

Figura 16. Gel de DGGE que representa los diferentes productos de PCR resultado de la amplificación del gen MAP1506 en *M. a. paratuberculosis* de tipo I, II y III. La migración en el gel de DGGE varía en función de la presencia de SNPs, los cuales son específicos para cada uno de los tipos (Griffiths y col. 2008).



7.6. Tipificación molecular mediante el análisis de polimorfismos de nucleótido único

Los polimorfismos de nucleótido único o SNPs son cambios en una única base que tienen lugar en la secuencia de bases del ADN y que se han descrito como responsables de la presencia de ciertos fenotipos en *M. tuberculosis* (Collins y col. 1995).

En la actualidad, el análisis de SNPs ha sido empleado en las especies pertenecientes al género *Mycobacterium* como herramienta para diferenciar aquellas que están filogenéticamente relacionadas y también en la subtipificación molecular de las mismas (Musser y col. 2001; Fleischmann y col. 2002; Hughes y col. 2002; Tracevska y col. 2002; Alland y col. 2003; Ramaswamy y col. 2003; Baker y col. 2004; Dolzani y col. 2004; Arnold y col. 2005; Goh y col. 2005; Goh y col. 2006; Huard y col. 2006; Marme y col. 2006; Romero y col. 2006; Brimacombe y col. 2007; Hebert y col. 2007; Olano y col. 2007; Sun y col. 2007; Talarico y col. 2007; Chakravort y col. 2008; Djelouadji y col. 2008; Hunt y col. 2008; García Pelayo y col. 2009; Kaser y col. 2009).

En el caso específico de *M. a. paratuberculosis*, los SNPs han sido empleados en diferentes trabajos como herramienta de diferenciación entre los diferentes tipos de cepas (Marsh y col. 1999; Whittington y col. 2001; Pickup y col. 2005; Sivakumar y col. 2005; Bhide y col. 2006; Marsh y col. 2006; Pickup y col. 2006; Semret y col. 2006; Turenne y col. 2006; Castellanos y col. 2007; Scanu y col. 2007; Castellanos y col. 2008; Griffiths y col. 2008; Turenne y col. 2008; Castellanos y col. 2009; Möbius y col. 2009; Sohal y col. 2009).

Sin embargo, de todos los SNPs descritos en la literatura, tan sólo los genes de la *girasa* a y b (Castellanos y col. 2007; Möbius y col. 2009), *recF* (Turenne y col. 2008), MAP1506 (Griffiths y col. 2008), *inh-A* (Castellanos y col. 2008) y los SNPs observados en la secuencia IS900 (Castellanos y col. 2009) fueron capaces de distinguir los tres tipos de *M. a. paratuberculosis* I (u ovino), II (o bovino) y III (o intermedio).

Enmarcada dentro de la técnica de detección de SNPs, el análisis de mutaciones puntuales presentes en el gen *hsp65* ha sido el método más ampliamente utilizado en la caracterización molecular no sólo de los aislados de *M. a. paratuberculosis*, sino también para otros miembros de MAC. Este gen, denominado *groEL2*, proteína de estrés al calor de 65 KDa o *hsp65* está constituido por más de 1600 pb y ha sido empleado en el diagnóstico molecular de las micobacterias desde su inicial descripción (Telenti y col. 1993). En este gen, tan sólo la región altamente conservada, constituida por 441 pb fue capaz de distinguir más de 111 especies de micobacterias. Esta región además ha sido empleada para la técnica de PCR y posterior restricción enzimática con las enzimas *BstEII* y *HaeIII* (<http://app.chuv.ch/prasite>).

En lo que respecta a los miembros de MAC, la secuenciación completa de este gen reveló un total de 11 SNPs (localizados entre las posiciones 240 y 1536), y la combinación de estos SNPs permitió la discriminación de algunos de los miembros de MAC. Como resultado se obtuvieron un total de 14 serovares o variantes genómicas; nueve pertenecientes a las cepas de *M. avium* y cinco para las cepas de *M. chimera* y *M. intracellulare*. Además, el extremo 3' del gen *hsp65* fue capaz de diferenciar algunos de los miembros de MAC, incluyendo dos de los tres tipos de *M. a. paratuberculosis* (denominados en este estudio como tipos ovino o S y bovino o C). En relación con los aislados de *M. a. hominissuis*, se identificaron un total de seis genotipos (presentando la cepa referencia *M. a. hominissuis* 104 el código 1), resultando éste ser el grupo más heterogéneo (Tabla 6) (Turenne y col. 2006).

Tabla 6. Adaptación de los datos basados en la secuenciación del gen *hsp65* en los distintos miembros de MAC (Turenne y col. 2006).

Código-miembros MAC ¹		240	276	324	612	633	645	861	1092	1128	1136	1218	1269	1272	1296	1350	1435	1468	1488	1536
<i>Mah 104</i>	Código 1	C	G	C	C	C	C	G	G	C	C	A	G	C	C	G	A	G	G	A
	Código 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C
	Código 2	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C
	Código 8	-	-	T	-	-	-	-	-	-	T	G	-	-	-	-	-	-	-	C
	Código 3	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	G	C	G	-	-	-	-	-	C
<i>Maa/ Mas</i>	Código 4	-	-	-	-	-	T	-	-	G	-	G	C	G	-	-	-	-	-	C
	Código 7	-	C	-	-	-	-	-	A	G	-	-	C	G	-	A	-	-	-	C
<i>Map S</i>	Código 6	T	-	-	G	G	-	T	-	G	-	G	C	G	-	-	-	A	C	C
<i>Map C</i>	Código 5	-	-	-	G	G	-	T	-	G	-	G	T	G	A	-	-	A	C	C

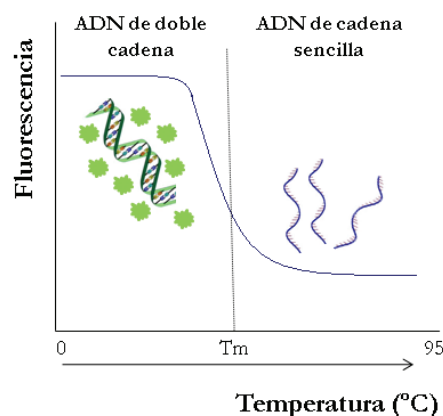
Aparte de estas mutaciones, la secuenciación del gen *hsp65* en *M. a. paratuberculosis* se ha realizado también en otros estudios posteriores. En uno de ellos se secuenció un fragmento de 374 pb en una cepa del tipo bovino y en otra de tipo ovino y se observaron mutaciones en las posiciones 240 y 408 pb (Marsh y Whittington, 2006).

7.7. Análisis de curvas de disociación de alta resolución (*High resolution melt analysis, HRM*)

Esta técnica molecular se basa en el análisis de las curvas de disociación generadas tras la amplificación del gen o secuencia diana mediante PCR en tiempo real. Para ello se emplean colorantes intercalantes (Evagreen, LC-Green, Syto9, etc.) de alta afinidad por el ADN de doble cadena y los cuales solo dan fluorescencia mientras el ADN se mantenga en este estado.

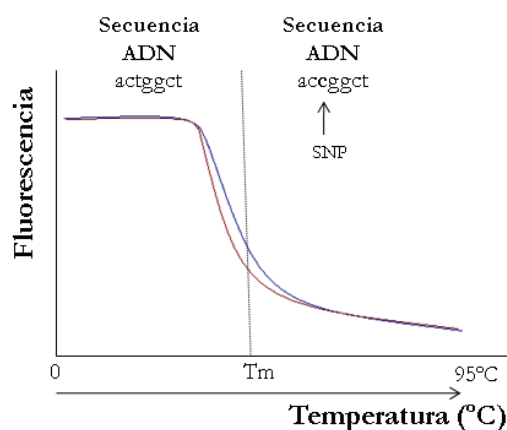
Una vez amplificado el gen diana en el que se encuentran las mutaciones puntuales de interés mediante una PCR en tiempo real en el que se emplean colorantes intercalantes, se produce un incremento de temperatura, incremento durante el cual el ADN pasa de un estado en forma de doble cadena a un estado de cadena simple. Durante este proceso de desnaturalización del ADN se produce la liberación del colorante intercalante, el cual sólo da fluorescencia mientras se mantiene unido al ADN en forma de doble hélice, y ésta disminuye a medida que el ADN cambia de estado (Figura 17). De esta manera, a medida que aumenta la temperatura el colorante es liberado de la doble cadena de ADN, y la señal luminosa producida es cuantificada por el aparato de PCR en tiempo real.

Figura 17. Imagen que representa el nivel de fluorescencia en función del incremento de la temperatura y el cual se relaciona al cambio de estado conformacional del ADN de doble cadena a cadena sencilla.



El proceso de cambio de la conformación de ADN de doble cadena a cadena sencilla depende de diferentes factores como la secuencia de ADN (especialmente el contenido en GC), la longitud de la secuencia, y otros factores que puedan influenciar el comportamiento termodinámico del ADN (como la cantidad de ADN en la muestra original, la concentración de sales, etc.). Las dos primeras diferencias relacionadas con la composición de la secuencia de ADN y su longitud son predecibles y el análisis de las curvas de disociación de alta resolución es capaz de monitorizar estas variaciones (Figura 18).

Figura 18. Análisis de las curvas de disociación de alta resolución en el que se representa la fluorescencia generada por el colorante intercalante (eje Y) en función del incremento de temperatura (eje X) para dos variantes de un mismo gen.



En el género *Mycobacterium* esta técnica ha sido únicamente empleada en *M. tuberculosis* para la detección de SNPs en el gen *rpoB*, estudio en el que se incluyeron 49 aislados (Pietzka y col. 2009) y en otro trabajo en el que analizaron un total de 153 aislados (Hoek y col. 2008).

7.8. Hibridación genómica comparada (HGC) por microarray

La tecnología de microarray (array, microchip, biochip, chip de ADN o chip genético) se ha empleado en diferentes áreas de la biología debido a la gran cantidad de información que es capaz de aportar en tan sólo un experimento. Los microarrays tradicionales contienen sondas de ADN que se encuentran inmovilizados en una superficie sólida o chip. Estas sondas se hibridan con un ADN diana y otro ADN control que a su vez se encuentran hibridados fluorescentemente con dos cromógenos diferentes, comúnmente Cy3 y Cy5. La fluorescencia originada es captada, escaneada y posteriormente procesada mediante el análisis de la imagen generada y un software de análisis de datos específico (Gabig y Wegrzyn, 2001; Chaudhuri, 2005; Ehrenreich, 2006; Jaluria y col. 2007).

En micobacterias, los tipos de microarray que se han empleado han sido dos: microarrays de oligonucleótidos de alta densidad y los microarrays de productos de PCR (o *spotted microarray*). Los primeros se generan mediante la síntesis de los oligonucleótidos directamente en un chip mediante una reacción química conocida como fotolitografía. Esta técnica permite la producción de chips de alta densidad compuestos por miles de sondas cortas (entre 15 y 70 nucleótidos), dirigidos a los distintos genes de un genoma específico. De este modo, para completar la totalidad de la secuencia del gen diana se agrupan varias sondas, denominadas grupo de sondas o *group set*. Dentro de este grupo de sondas cada una (que presenta una secuencia 100% homóloga para dar lugar a una completa hibridación) va además acompañada de un control negativo, que consiste en la misma secuencia con un cambio de base dentro de la sonda, facilitando así la detección y eliminación de hibridaciones inespecíficas (Aguado y Blanco, 2007). Este tipo de microarray contiene varias secuencias diferentes para un mismo gen, por lo que se puede emplear para la identificación de diferentes alelos de un gen determinado (Lipshutz y col. 1999). El microarray de productos de PCR se caracteriza porque cada una de las sondas empleadas en este tipo de microarray se corresponde con un único gen o su transcrito. En este caso, las sondas presentan tamaños que oscilan entre 200 y 800 nucleótidos, aunque si se trata de oligonucleótidos sintéticos

éstos pueden ser más cortos (50-70 nucleótidos). En el caso concreto de *M. a. paratuberculosis*, la técnica de microarray se ha empleado con distintas finalidades y están resumidas en la Tabla 7 (Pribylova y col. 2009).

Tabla 7. Resumen de los trabajos en los que se ha aplicado la tecnología del microarray en *M. a. paratuberculosis*.

Tipo de microarray	Tipo de muestra	Diana empleada	Área de aplicación	Referencia
GeneChip (Affymetrix): secuencias únicas de ARNr 16S y <i>rpo</i>	Aislados clínicos humanos	ARN complementario (de ADN genómico)	Diagnóstico	(Troesch y col. 1999)
Microarray de ADN con sondas específicas				(Tobler y col. 2006)
Microarray de genoma completo de <i>M. a.</i> <i>paratuberculosis</i>	Oveja, vaca	ADN genómico	Hibridación genómica comparada	(Marsh y col. 2006)
	Armadillo, bisonte, cabra, estornino, gato, hombre, oveja, paloma, pato, pollo, vaca y cepa de referencia de <i>M. a. silvaticum</i>			(Paustian y col. 2008)
Microarray de genoma completo de <i>M. a. avium</i>	Cabra, oveja, vaca y visón			(Paustian y col. 2005)
	Oveja, vaca,			(Semret y col. 2004)
	Cabra, ciervo, cerdo, conejo, hombre, oveja, vaca y muestra desconocida			(Semret y col. 2005)
	Antílope, cabra, ciervo, hombre, oryx, rinoceronte blanco y vaca			(Wu y col. 2006)
Array de genoma completo de <i>M. a. avium</i> y <i>M. a. paratuberculosis</i>	Aislados tipo “bovino”			(Semret y col. 2006)
	Cabra, oveja y vaca			(Castellanos y col. 2009)
Microarray de genoma completo de <i>M. a.</i> <i>paratuberculosis</i>	<i>M. a. paratuberculosis</i> ATCC 19698	ADN circular (ADNc) de <i>M. a.</i> <i>paratuberculosis</i>		(Wu y col. 2007)
Microarray de ADNc de células bovinas	Vaca	ADNc de células mononucleares de sangre periférica	Estudios de expresión génica	(Coussens y col. 2002; Coussens y col. 2003; Coussens y col. 2005)
		ADNc de tejido ileal		(Aho y col. 2003)
GeneChip Humano (Affymetrix)	Macrófagos bovinos infectados con <i>M. a.</i> <i>paratuberculosis</i>	ADNc de macrófagos		(Weiss y col. 2004; Murphy y col. 2006)
		ARNc (de ADNc) de macrófagos		(Weiss y col. 2004)
Microarray de genoma completo de <i>M. a.</i> <i>paratuberculosis</i>	Células epiteliales bovinas infectadas con <i>M. a.</i> <i>paratuberculosis</i>	ADNc de células epiteliales		(Patel y col. 2006)
Microarray de ADNc de células bovinas	Leucocitos de vacas infectadas con <i>M. a.</i> <i>paratuberculosis</i>	ADNc de leucocitos		(Skovgaard y col. 2006)
Microarray de genoma completo de <i>M. a.</i> <i>paratuberculosis</i>	Macrófagos humanos infectados con <i>M. a.</i> <i>paratuberculosis</i>	ARNc (de ADNc) de macrófagos		(Motiwala y col. 2006)

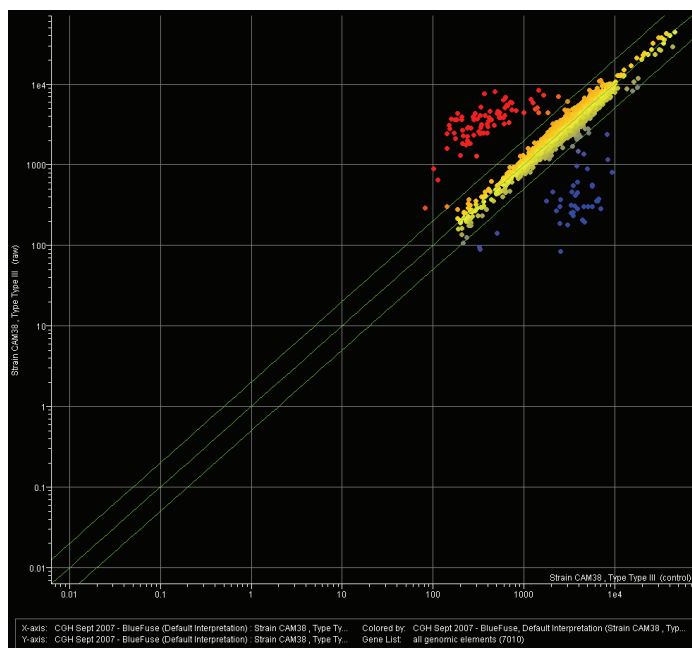
Finalmente, la disponibilidad actual de los genomas bacterianos completos han permitido el desarrollo de la tecnología del microarray, la cual aporta una gran cantidad de información en poco tiempo; sin embargo, la interpretación de los resultados obtenidos con

esta técnica es laboriosa y además es necesaria la confirmación de los resultados obtenidos mediante la realización de otras técnicas moleculares complementarias como PCR, etc.

7.9. Fragmentos polimórficos largos (*Large sequence polymorphisms, LSP*)

Los estudios de HGC realizados con la tecnología del microarray permitieron la descripción de los fragmentos polimórficos largos (*large sequence polymorphisms, LSP*) y de las islas genómicas (*genomic islands, GI*), fragmentos del genoma únicos y específicos de los genomas de *M. a. paratuberculosis* y de *M. a. avium* (Semret y col. 2004; Semret y col. 2005; Paustian y col. 2005; Marsh y col. 2006; Paustian y col. 2008; Castellanos y col. 2009) (Figura 19).

Figura 19. Imagen obtenida con el programa GeneSpring 7.3.1 que representa los LSP y genes noveles específicos para las cepas tipo III (o intermedias). En azul están representados todos y cada uno de los genes deletados en las cepas tipo III en comparación con la cepa de referencia *M. a. paratuberculosis* K-10. En rojo están reflejados todos los genes presentes en las cepas tipo III y *M. a. hominissuis* 104, pero ausentes en *M. a. paratuberculosis* K-10. En amarillo están representados todos los genes que se encuentran presentes tanto en la cepa de *M. a. paratuberculosis* tipo III como en la cepa K-10.



Los resultados de microarray revelaron seis inserciones genómicas exclusivas de *M. a. paratuberculosis* no presentes en *M. avium* y a los cuales se les denominó LSP^P4, 11, 12, 14, 15 y 16 (Semret y col. 2004). Estos LSP comprendían 125 kb, con genes implicados en diferentes funciones como transporte y metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y compuestos inorgánicos, metabolismo de coenzimas y lípidos, mantenimiento de la estructura ribosómica, regulación transcripcional, codificación de proteínas de membrana, proteínas PPE, transposasas y otras proteínas de funciones desconocidas (Turenne y col. 2008).

Entre los LSP específicos de *M. a. paratuberculosis* destaca el LSP^P14 (de 65,1 kb de longitud), el cual presenta una estructura en forma de mosaico en el que sus ORFs se encuentran en bloques funcionales separados por transposones. Dentro de estos bloques hay algunos que intervienen la adquisición de metales, incluyendo la absorción de sideróforos (MAP3726-3729), la absorción de metales inorgánicos (MAP3731-3736), la biosíntesis de sideróforos (MAP3740-3746), otros que codifican para varias proteínas de transporte y metabolismo y un regulador transcripcional del tipo *AraC* (MAP3758). A su vez, parte de este LSP está también comprendido dentro de la isla de patogenicidad de 38 Kb descrita por Stratmann y colaboradores (Stratmann y col. 2004).

En lo relativo a los LSP específicos de cada uno de los tipos de *M. a. paratuberculosis*, cabe destacar el LSP^A20, también denominado “delección 1” o INDEL6 (8 kb), presente en los genomas de *M. a. paratuberculosis* tipo II (o bovino) y *M. avium* y ausente en las cepas I/III (Marsh y Whittington, 2005; Marsh y col. 2006; Semret y col. 2006). En otros trabajos se ha analizado la presencia/ausencia de este LSP^A20 en cepas de *M. a. paratuberculosis* de los tipos I y III, detectándose la ausencia del mismo en ambos (Álvarez y col. 2008; Castellanos y col. 2009). También se ha analizado la presencia/ausencia en aislados de *M. a. paratuberculosis* de origen indio de tipo II, confirmándose la presencia de éste en todos ellos (Sohal y col. 2009). La ausencia de este LSP fue corroborada en nuestro estudio de HGC en un mayor número de cepas de *M. a. paratuberculosis* del tipo I y III (Castellanos y col. 2009). Otro de los LSP delecionados en las cepas de *M. a. paratuberculosis* del tipo I y III pero presentes en las del tipo II es la delección RDA-III (Marsh y Whittington, 2005), también denominada “delección 2” (Marsh y col. 2006) o INDEL7 (Castellanos y col. 2009). Este LSP comprende un total de 17 ORFs, dentro de los cuales se incluyen reguladores transcripcionales, un gen perteneciente a la familia PPE, un transportador de membrana y otros genes con diferentes actividades metabólicas.

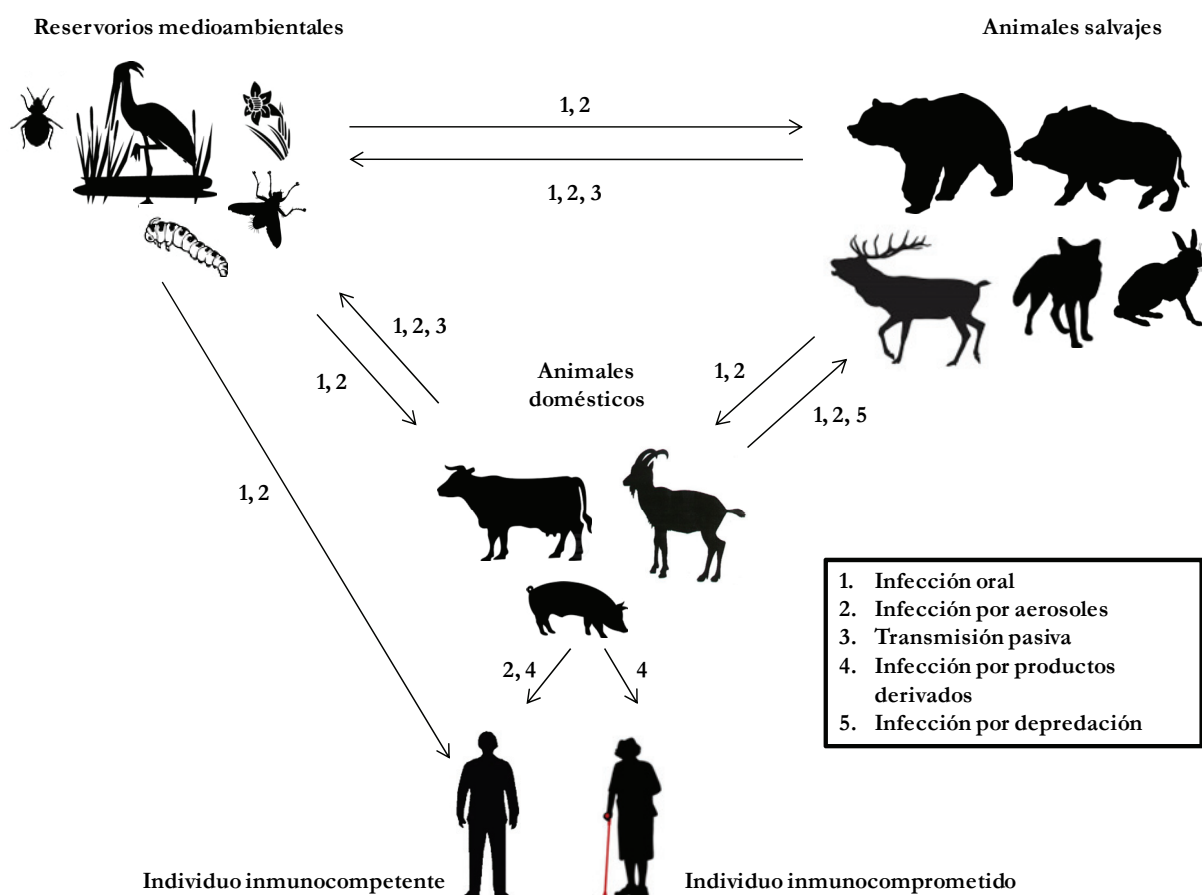
Finalmente cabe destacar la presencia de un LSP específico en las cepas de *M. a. paratuberculosis* de los tipos I y II pero ausentes en las del tipo III, el denominado INDEL4. Este LSP comprende seis ORFs con funciones relacionadas con el metabolismo lipídico y de los ácidos grasos (Paustian y col. 2008; Castellanos y col. 2009). Este LSP fue inicialmente descrito como ausente en el denominado grupo “genotipo ovino” mediante la técnica de microarray (Paustian y col. 2008). Otro trabajo posterior confirmó la presencia de este LSP en todos los aislados del tipo bovino, pero tan sólo en tres de cuatro aislados del tipo ovino (Alexander y col. 2009).

8. La enfermedad de Johne o paratuberculosis

La enfermedad de Johne o paratuberculosis es una infección crónica, progresiva y debilitante causada por el agente etiológico *M. a. paratuberculosis*. La implicación de este microorganismo en la etiología de la enfermedad fue descrita por primera vez por el profesor Johne y el doctor Frothingham en 1895 en el Instituto de Patología Veterinaria de Dresden (Alemania).

La paratuberculosis se ha descrito en multitud de hospedadores, pero ésta afecta principalmente a rumiantes (bisonte, cabra, ciervo, oveja, vaca y otros no domésticos) aunque también en otras especies como caballos, cerdos, mulas, perros, pollos y primates (Hermon-Taylor y El-Zaatari, 2004; Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003). La ruta de transmisión principal es la fecal-oral, aunque también se han descrito otras como la intravenosa (Kluge y col. 1968), la intramamaria (Larsen y Miller, 1978), la intrauterina (Merkal y col. 1982), etc. Además, otra de las posibles vías de infección que se ha considerado es la de la depredación en el caso de los carnívoros, puesto que el porcentaje de aislamiento de *M. a. paratuberculosis* en los depredadores es de un 62%, en comparación con el 10% de aislamiento de *M. a. paratuberculosis* en las presas (Greig y col. 1997; Greig y col. 1999). Todo esto parece indicar la existencia del posible papel de los animales salvajes en la epidemiología de la enfermedad de la paratuberculosis (Figura 20) (Biet y col. 2005). Ya que los miembros de MAC se han descrito en un amplio rango de hospedadores de especies domésticas (incluidas especies de importancia agropecuaria) (Thorel y col. 1997; Biet y col. 2005), el consumo de productos derivados o el contacto con estos animales también podría constituir una vía de potencial infección para el hombre (Figura 20).

Figura 20. Posibles rutas de transmisión y de infección de MAC. En la ilustración se refleja las posibles rutas de transmisión de MAC entre el medioambiente, los animales salvajes, el ganado y el hombre. 1: Infección oral; 2: infección por aerosoles; 3: infección pasiva; 4: infección a través de productos derivados; 5: infección por depredación (adaptación de Biet y col. 2005).



8.1. Signos clínicos y progresión de la enfermedad en ganado vacuno

Los signos clínicos de la enfermedad son poco evidentes, a veces variables y están asociados principalmente a los diferentes estadios de la enfermedad (Whitlock y Buergelt, 1996; Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003). Así la progresión de la enfermedad se divide en cuatro estadios o fases:

Fase I. Infección silente. Esta fase se caracteriza por la ausencia de signos clínicos de la enfermedad y se encuentra presente fundamentalmente en terneros y novillas, aunque en ocasiones también se ha descrito en ganado adulto.

Fase II. Fase subclínica. En este estadio se encuentran principalmente animales adultos portadores de *M. a. paratuberculosis*. Durante el transcurso de esta fase los animales no presentan sintomatología alguna de la enfermedad pero en ocasiones pueden presentar anticuerpos circulantes o respuestas inmunes celulares alteradas. Además, la gran mayoría de los animales son negativos al cultivo en heces, aunque a pesar de esto los animales excretan en heces una carga microbiana baja de manera intermitente.

Fase III. Fase clínica. Esta fase sólo se desarrolla tras varios años de infección por *M. a. paratuberculosis*. Los signos clínicos iniciales y característicos de esta fase son el de la caída de la producción láctea, pelo hirsuto, pérdida de peso y diarrea.

Fase IV. Fase clínica avanzada. El paso de la fase anterior a esta fase tiene lugar en tan solo unas pocas semanas, durante las cuales los animales entran en un estado de letargo, debilitación y emaciación. Esta fase se caracteriza a su vez por la aparición de un edema intermandibular debido a la presencia de hipoproteinemia, además de la presencia de caquexia y diarrea profusa. Es en este estadio en el que los animales son sacrificados debido a la reducción en la producción lechera y a la pérdida de peso, aunque en ocasiones algunos animales mueren por la deshidratación severa y la caquexia que tiene lugar.

M. a. paratuberculosis puede permanecer en el tracto gastrointestinal de animales subclínicamente infectados durante años sin causar síntoma alguno de la enfermedad, los cuales pueden llegar a manifestarse debido al estrés originado durante la lactancia (normalmente en la segunda o tercera lactación) o la presencia de una elevada densidad animal entre otros factores (Manning y Collins, 2001). Sin embargo, aunque los animales son más susceptibles cuando la infección se origina a edades tempranas (hasta el desarrollo clínico de la enfermedad pueden transcurrir meses o incluso años), la enfermedad se puede iniciar en animales adultos sanos si éstos se ven expuestos a una elevada carga infectiva de *M. a. paratuberculosis* (Rankin, 1961). En lo que respecta a la susceptibilidad genética de hospedador en cuanto al desarrollo de la enfermedad, se han descrito diversos factores como los asociados a especie y raza. Se ha demostrado que tanto cobayas como ratas son

particularmente resistentes a la enfermedad, mientras que los ciervos jóvenes y las cabras son altamente susceptibles. Dentro de las razas bovinas, la raza *Channel Island*, Limusina y otras razas como la raza *Welsh Black* son especialmente susceptibles (Hermon-Taylor y El-Zaatari, 2004).

A su vez, la paratuberculosis tiene un elevado impacto económico de especial relevancia en el ganado vacuno lechero, ya que una de las principales manifestaciones clínicas en el ganado es el de la caída de la producción láctea (Nordlund y col. 1996), la reducción de la vida productiva media debido a la necesidad de un sacrificio temprano con la consiguiente disminución en la mejora genética de los rebaños (o las razas) (Kennedy y Benndictus, 2001), la depreciación del valor de la canal (Manning y Collins, 2001) y la disminución de la fertilidad del animal (Johnson-Ifeorulundu y col. 2000). En un estudio reciente se vio que el peso y el valor de la canal se vieron reducidos en un 10 y un 17% respectivamente en vacas positivas al ELISA en comparación con vacas negativas a este ensayo y en un 15 y un 31% respectivamente en aquellas positivas al cultivo fecal (Kudahl y Nielsen, 2009).

8.2. Signos clínicos y progresión de la enfermedad en otros animales

En lo que respecta a los signos clínicos de la enfermedad en ovejas y cabras, éstos son similares a los descritos en vacas, aunque la presencia de diarrea es menos frecuente que en vacas y la aparición de la enfermedad se da en animales más jóvenes (Stehman, 1996). En el caso de otros rumiantes no domésticos, los signos clínicos son más variables aunque similares a los anteriormente descritos en el caso de vacas. Otras especies animales pueden cursar sin sintomatología clínica, como se demostró en un estudio en el que se analizaron conejos europeos infectados con *M. a. paratuberculosis* (Greig y col. 1997).

8.3. Prevalencia de la enfermedad en Europa

La prevalencia individual de paratuberculosis en Europa en el ganado vacuno entre los años 1990 y 2008 presenta diferentes valores que varían desde cero en países como Suecia al 19% en otros como Suiza y Austria (Nielsen y Toft, 2009) (Tabla 8). También en el caso de pequeños rumiantes la prevalencia descrita en la literatura es muy variada, desde 0% en Grecia y Reino Unido hasta el 50% en países como España (Tabla 9).

Tabla 8. Resumen adaptado de las prevalencias individuales de paratuberculosis en Europa en ganado vacuno (Nielsen y Toft, 2009).

País/región	Período de estudio	Prevalencia aparente	Referencia
Alemania/Arnsberg	1993	1,5%	(Bottcher y Gangl 2004)
Alemania/Arnsberg	1993	1,4%	(Bottcher y Gangl 2004)
Alemania/Bavaria	2005	1,5%	(Bottcher y Gangl 2004)
Alemania/Bavaria	2005	0,9%	(Bottcher y Gangl 2004)
Alemania/Bavaria	2005	24%	(Bottcher y Gangl 2004)
Alemania/Sajonia	2002-2004	4,4%	(Donat y col. 2005)
Austria/todas	Desconocido	19,0%	(Dreier y col. 2006)
Austria/4 regiones	1995-1997	6,0%	(Gasteiner y col. 1999)
Bélgica/todas	1997-1998	0,9%	(Boelaert y col. 2000)
Eslovenia/todas	1997	0,4%	(Ocepek y col. 1999)
Eslovenia/todas	1998	1,2%	(Ocepek y col. 1999)
Eslovenia/todas	2000-2001	0,4%	(Ocepek y col. 2002)
Eslovenia/todas	1999	3,4%	(Ocepek y col. 2002)
Francia/Yonne	1998-1999	3,3%	(Petit, 2001)
Holanda/todas	1998	2,5%	(Muskens y col. 2000)
Italia/Latium	Desconocido	2,4%	(Lillini y col. 2005)
Italia/Véneto	2000-2001	3,5%	(Robbi y col. 2002)
Italia/Verona	1997-1998	6,8%	(Vicenzoni y col. 1999)
Noruega/desconocido	1996-1997	7,7%	(Tharaldsen y col. 2003)
Noruega/todas	2002	0,1%	(Mork y col. 2003)
República de Irlanda/animales importados	1997	3,6%	(O'Doherty y col. 2002)
Reino Unido/sur-oeste	2004	3,5%	(Cetinkaya y col. 1996)
Suecia/todas	2000-2001	0%	(Sternberg, 2003)
Suecia/todas	1995-1996	0%	(Viske y col. 1996)
Suiza/Plateau de Diesse	Desconocido	5,1%	(Meylan y col. 1995)
Suiza/todas	1993-1994	0,7%	(Stärk y col. 1997)
Suiza/desconocida	2005	19,8%	(Bosshard y col. 2006)
Turquía/desconocida	Desconocido	4,6%	(Atala y Akcay, 2001)
Turquía/Trakya	Desconocido	0%	(Ikiz y col. 2005)
Turquía/Elazig	1997-1998	5,0%	(Cetinkaya y col. 2000)

Tabla 9. Resumen adaptado de las prevalencias individuales de paratuberculosis en Europa en ovejas y cabras (Nielsen y Toft, 2008).

Especie animal	País/región	Año	Prevalenc. aparente	Referencia
Cabra	Grecia/ Islas Espóradas	Desconocido	0%	(Minas y col. 1994)
Cabra	España/Ávila	1996	52%	(Reviriego y col. 2000)
Cabra	Suiza/todas	2002	23%	(Muehlherr y col. 2003)
Cabra	Reino Unido/Inglaterra, Gales, Irlanda del Norte	1998	1%	(Grant y col. 2001)
Rebaño mixto de ovejas y cabras	Eslovenia/todas	2000-2001	12%	(Ocepek y col. 2002)
Rebaño mixto de ovejas y cabras	Portugal/Lisboa	Desconocido	27%	(Mendes y col. 2004)
Ovejas	Grecia/Norte Islas Espóradas	Desconocido	0%	(Minas y col. 1994)
Ovejas	España/Ávila	1996	29%	(Reviriego y col. 2000)
Ovejas	Reino Unido/Inglaterra, Gales, Irlanda del Norte	1998	0%	(Grant y col. 2001)
Ovejas	Suiza/todas	2002	24%	(Muehlherr y col. 2003)

9. Diagnóstico de la enfermedad de Johne

Los ensayos o pruebas que se emplean en la actualidad están dirigidos o bien a la detección de *M. a. paratuberculosis* de forma directa o a la detección de la respuesta inmune del hospedador. El ensayo de elección para el diagnóstico de la enfermedad de Johne o paratuberculosis depende de la fase de la enfermedad (ver capítulo 8.1, páginas 60-62) (Tabla 10).

En la fase I los animales se encuentran infectados pero están en un estadio asintomático de la enfermedad, en el cual no hay detección de microorganismos en heces; ya en la fase II los animales no presentan signos clínicos de la enfermedad pero el microorganismo se puede detectar en heces; en la fase III los animales exhiben manifestaciones clínicas como la pérdida de peso y la diarrea y en la fase IV los animales presentan un estado de letargo, emaciación y diarrea profusa.

Tabla 10. Capacidad de detección de los ensayos diagnósticos en función de la fase clínica de la enfermedad (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003).

Tipo de ensayo	Fase I	Fase II	Fases III y IV
Signos clínicos de la enfermedad	No	No	Si
Cultivo de heces	No	En ocasiones	Si
PCR	No	En ocasiones	Si
Tinción de ácido-alcohol resistencia	No	En ocasiones	Si
γ -IFN	En ocasiones	Si	En ocasiones
Serología	No	En ocasiones	Si

9.1. Detección directa de *M. a. paratuberculosis*

Diagnóstico macroscópico. Aunque no hay una correlación entre la severidad de los signos clínicos de la enfermedad de Johne y la extensión de las lesiones intestinales, hay signos característicos de la enfermedad como el engrosamiento de la mucosa intestinal, edema en intestino y linfonodos mesentéricos y linfangiectasia. Sin embargo, para poder diagnosticar la enfermedad es preciso realizar también un análisis histológico de los distintos segmentos intestinales y de los linfonodos mesentéricos, así como el cultivo de los mismos y posterior aislamiento del agente etiológico.

Tinción directa. Este método se basa en el empleo de la tinción de Ziehl-Neelsen sobre un frotis obtenido a partir de la mucosa intestinal o de las heces. En el caso en el que se observen agregados bacterianos (de tres o más microorganismos) de bacterias ácido-alcohol resistentes se puede realizar un diagnóstico presuntivo. Sin embargo, la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes no es específico de *M. a. paratuberculosis*, con lo que este ensayo no es conclusivo.

Cultivo convencional. Esta técnica está incluida dentro del grupo de pruebas dirigidas a la detección directa de *M. a. paratuberculosis*. Este es el método más empleado en la actualidad en la gran mayoría de los países y se considera la prueba de referencia (o *gold standard*). La principal desventaja que presenta este método es el crecimiento lento característico de *M. a. paratuberculosis* (especialmente en el caso de las cepas del tipo I y III), además de la presencia de formas no cultivables de *M. a. paratuberculosis* (Gunnarsson y Fodstad, 1979; Whittington y col. 2000). Este método, de acuerdo al Manual de ensayos diagnósticos y vacunas para animales terrestres de la Organización Internacional de Epizootías (OIE) es el que presenta 100% especificidad, no dando lugar a falsos positivos (OIE, 2008).

El cultivo a partir de heces en medio sólido es capaz de detectar entre el 30 y el 40% del ganado infectado, ya que únicamente detecta animales que excretan más de 100 unidades formadoras de colonias por gramo de heces (Whitlock y col. 2000; Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003). No obstante, éste método únicamente identifica a los animales en un estadio clínico de la enfermedad avanzado (donde alcanza un 100% de sensibilidad) siendo detectados tan sólo unos pocos animales en los estadios iniciales (Whitlock y col. 2000).

Se han descrito diferentes medios de cultivo para *M. a. paratuberculosis*, en los que destaca la presencia de micobactina J (ver capítulo 3, páginas 15-17). Así, los medios de cultivo recomendados por la OIE (todos con micobactina añadida) son el Herrold's con yema de huevo (*Herrold's egg yolk medium*, HEYM), Middlebrook 7H9, 7H10 y 7H11, medio Dubos y el Löwestein-Jensen (OIE, 2008).

El método de procesamiento de la muestra más empleado es el originalmente descrito por Greig y colaboradores (Greig y col. 1999). Brevemente, los tejidos se homogenizan en 10 ml de agua destilada y al homogenizado anterior se le añaden 10 ml de cloruro de hexadecil piridinio (*hexadecyl pyridinium chloride*, HPC) al 1,5%, incubándose a temperatura ambiente durante 18 horas para una correcta descontaminación. Seguidamente,

los sobrenadantes se centrifugan a 3800 g durante 30 minutos y el precipitado resultante se homogeniza en 10 ml de agua destilada. De nuevo se centrifugan los precipitados anteriores en las mismas condiciones de centrifugación y el sedimento resultante se disuelve en 0,5 ml de agua destilada. Finalmente, 0,1 ml de la suspensión anterior se inocula en los medios de cultivo y se incuban a 37°C durante al menos tres meses hasta la obtención de crecimiento visible (Figura 21).

Figura 21. Diferente apariencia macroscópica de las colonias de *M. a. paratuberculosis* en el medio Middlebrook 7H11 con micobactina (imagen obtenida en el centro VISAVET).



Cultivo radiométrico. El cultivo radiométrico está basado en la detección del isótopo CO_2^{14} , el cual es liberado a partir del ácido palmítico (que contiene C^{14}) como consecuencia del metabolismo bacteriano. Este método detecta con mayor rapidez la presencia de crecimiento de *M. a. paratuberculosis* en comparación con el cultivo tradicional en medio sólido, habiéndose descrito aislamientos positivos en nueve días tras la inoculación del medio de cultivo (Damato y Collins, 1990). Sin embargo el empleo de isótopos radiactivos no es posible en algunos laboratorios, además de ser un método de diagnóstico altamente costoso.

Cultivo no radiométrico. Este procedimiento se fundamenta en el empleo de medio de cultivo en el que se incorpora un sistema de detección que reacciona cuando se produce una alteración en la concentración de oxígeno, dióxido de carbono o presión en cada vial de cultivo (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003). Éste es un método automatizado en el que los resultados se descargan directamente a un ordenador. Inicialmente, en un estudio en el que se compararon las dos técnicas de cultivo no convencional se determinó que los niveles de sensibilidad y contaminación eran similares en cuanto a la detección de miembros de MAC y *M. tuberculosis* (Williams-Bouyer y col. 2000). Posteriormente, en otro trabajo comparativo entre esta técnica y el cultivo convencional a partir de heces de ganado vacuno se concluyó que este método de cultivo radiométrico era capaz de detectar *M. a. paratuberculosis* más rápido que el método convencional y por lo tanto presentaba una buena alternativa al cultivo convencional (Sitch y col. 2003).

Extracción directa de ADN. La extracción de ADN, la cual puede realizarse directamente desde el tejido o muestra biológica presenta ventajas como la de la obtención de resultados rápidos en comparación con la técnica de cultivo (Garrido y col. 2000).

El principal inconveniente de esta técnica es la presencia de inhibidores de PCR, sobretudo en el caso de la extracción de muestras procedentes de heces (Vary y col. 1990; Garrido y col. 2000). Sin embargo, la determinación de inhibidores en la PCR se puede realizar mediante la incorporación de plásmidos indicadores (Englund y col. 1999), eliminando estos inhibidores mediante un paso de purificación del ADN (Whittington y col. 1999) o mediante diluciones del ADN extraído (Garrido y col. 2000).

Los métodos de extracción directa de ADN en *M. a. paratuberculosis* se han empleado en muestras procedentes de heces (Garrido y col. 2000; Marsh y col. 2001; Eamens y col. 2007; Kawaji y col. 2007; Scott y col. 2007; Ireng y col. 2009), leche (Grant y col. 2001; Odumeru y col. 2001; Djonje y col. 2003; Kaur y col. 2010), sangre y tejidos (Gwozdz y col. 1997; Gwozdz y col. 2000; Bull y col. 2003; Naser y col. 2004; Juste y col. 2005).

En la actualidad los métodos de extracción directa de ADN descritos no están estandarizados y por lo tanto este tipo de ensayo se considera complementario a los ensayos de diagnóstico estandarizados descritos, ya que aumenta la sensibilidad en cuanto a la detección de animales positivos.

9.2. Detección de la respuesta inmune del hospedador

9.2.1. Pruebas serológicas

Estos ensayos se basan en la detección de la inmunidad humoral y son empleados principalmente en el caso de rumiantes domésticos.

Test de fijación del complemento (*Complement Fixation Test, CFT*). Esta prueba ha sido empleada como estándar para el diagnóstico de la enfermedad de Johne en ganado vacuno. Este ensayo está especialmente indicado en animales con sospecha de infección clínica, sin embargo su aplicación como herramienta de control poblacional de la enfermedad de Johne es limitada. En la actualidad, este ensayo es demandado por algunos países en los que se importa ganado vacuno (OIE, 2008). Esta prueba diagnóstica se caracteriza por su capacidad para detectar animales altamente infectados, sin embargo es una técnica que presenta una baja sensibilidad y tiene tendencia a producir falsos positivos (Whitlock y col. 2000).

Inmunodifusión en gel de agar (*Agar-gel immunodiffusion, AGID*). Esta prueba está principalmente indicada para la confirmación de la enfermedad de Johne en ganado caprino, ovino y vacuno con presencia de signos clínicos (Sherman y col. 1984). El empleo de esta técnica en pequeños rumiantes en Nueva Zelanda y Australia ha demostrado una mayor sensibilidad y especificidad que el ELISA (Gwozdz y col. 2000; Hope y col. 2000; Sergeant y col. 2003; OIE, 2008). La aplicación de este ensayo en el diagnóstico de animales subclínicamente infectados es reducida, aunque son mayores la sensibilidad y la especificidad en comparación con la prueba de CFT (Sherman y col. 1990).

Ensayo inmunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*). Esta técnica se caracteriza por presentar una mayor sensibilidad en comparación con las técnicas de CFT y AGID en cuanto a la detección de animales subclínicamente infectados que actúan como portadores de la enfermedad (OIE, 2008). Esta técnica es capaz de detectar entre un 30-40% del ganado vacuno identificado como positivo por el cultivo de heces en medio sólido (Whitlock y col. 2000). Sin embargo, esta sensibilidad depende de la edad del animal, aunque hay estudios en los que se ha calculado que la sensibilidad global total estimada para los diferentes grupos de edad es del 15% (Whitlock y col. 2000; Jubb y col. 2004). No

obstante, en pequeños rumiantes el ELISA comercial es el que presenta una mayor especificidad (entre el 98,2 y el 99,5%) en aquellos animales que presentan lesiones anatomopatológicas (Hope y col. 2000). Entre las principales ventajas de esta técnica destacan la automatización, la repetibilidad, el elevado número de muestras que es capaz de analizar y la objetividad de los resultados (Manning y col. 2001; Sergeant y col. 2003; OIE, 2008). En la actualidad es una de las pruebas que más se emplea para la determinación del nivel de infección en los rebaños (Nielsen y col. 2001). Además, la descripción de nuevos antígenos y anticuerpos más sensibles y específicos están permitiendo el desarrollo de nuevos ELISAs con mayores valores de sensibilidad y especificidad (Griffin y col. 2005; Eda y col. 2006; Speer y col. 2006).

9.2.2. Ensayo de la respuesta inmune mediada por células

La inmunidad mediada por células precede a la producción de anticuerpos detectables y por lo general, los animales que se encuentran subclínicamente infectados con *M. a. paratuberculosis* normalmente no reaccionan a las pruebas serológicas pero si producen una reacción positiva a los ensayos que miden la inmunidad mediada por células (OIE, 2008).

Prueba del gamma interferón (γ -IFN). Este ensayo está basado en la medición de la producción de γ -IFN por los linfocitos, los cuales son sensibilizados con antígenos específicos [tuberculina derivada de la proteína estándar aviar purificada (PPD aviar), PPD bovina o jonnina] durante un período de incubación de entre 18 y 36 horas (Wood y col. 1990). A continuación, la detección cuantitativa del γ -IFN producido se realiza a través de un ELISA de tipo sándwich, el cual emplea dos anticuerpos monoclonales dirigidos al γ -IFN. En la literatura se ha descrito que la especificidad de este ensayo varía entre el 67 y el 94% (Kalis y col. 2003) en función de los criterios de interpretación del mismo, ya que este ensayo fue inicialmente desarrollado para el diagnóstico de la tuberculosis bovina (OIE, 2008).

Hipersensibilidad retardada (*Delayed-type hypersensitivity, DTH*). Esta prueba de hipersensibilidad retardada mide la inmunidad mediada por células que se produce tras la inoculación intradérmica de un antígeno y la posterior medición de la induración del punto de inoculación a las 72 h. Inicialmente, los antígenos empleado fueron la PPD aviar y johnina hasta que un estudio demostró que la sensibilización de algunos animales con otras especies

de micobacterias miembros de MAC hacía que ambos antígenos no presentaran una elevada especificidad para el diagnóstico de la paratuberculosis (Inderlied y col. 1993). La interpretación de esta prueba es difícil por la falta de estandarización en lo que respecta a la lectura de la prueba. En un estudio se vio que el antígeno johnina presentaba una especificidad del 88,8% en ganado vacuno si el punto de corte de la induración dérmica era superior a 2 mm, del 91,3% si la induración era superior a 3 mm y del 93,5% si era mayor a 4 mm (Kalis y col. 2003).

10. Análisis histopatológico de la enfermedad de Johne

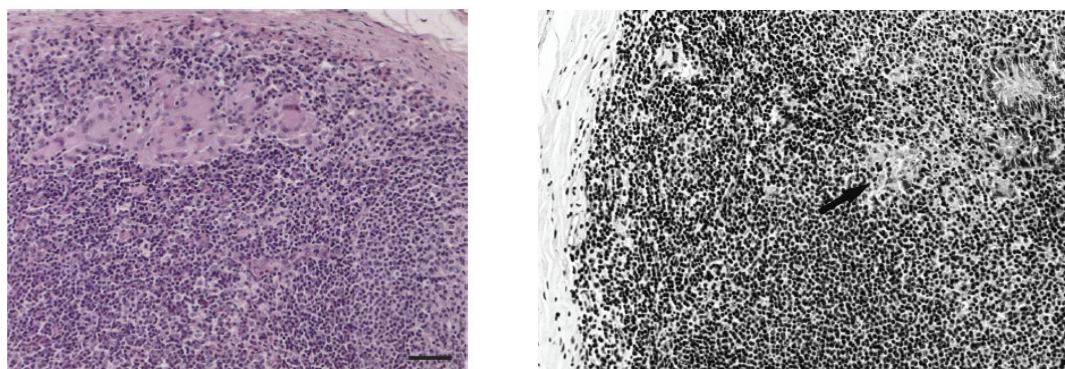
En pequeños rumiantes, las lesiones asociadas con la paratuberculosis se han clasificado en función de su localización en relación con el tejido intestinal linfoide, su intensidad, los tipos celulares que se encuentran en el proceso inflamatorio y el número de micobacterias presentes (Pérez y col. 1996; Corpa y col. 2000).

Así, en animales con presencia de signos clínicos se describieron lesiones de tipo difuso con dos formas patológicas principales, la paucibacilar y la multibacilar. La primera se caracterizaba por la presencia de un infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos con un bajo número de macrófagos con pocas o ninguna micobacteria en su interior y en la segunda por la presencia de macrófagos con micobacterias en su citoplasma (Carrigan y Seaman, 1990; Pérez y col. 1996; Clarke, 1997; Corpa y col. 2000). En cabras y ovejas sin signos clínicos de la enfermedad se describieron lesiones intestinales focales en las cuales se encontraron granulomas bien definidos (Pérez y col. 1996; Corpa y col. 2000). En el caso de ganado vacuno, también se ha descrito la presencia de granulomas focales en el tejido linfoide intestinal o en los linfonodos mesentéricos en los primeros estadios de la paratuberculosis experimental en terneros (Larsen y col. 1975). Estas lesiones también se describieron en vacas adultas (Balseiro y col. 2003) pero no es hasta más tarde cuando se detallaron y se compararon las lesiones observadas en el ganado vacuno con las anteriormente descritas para los ganados ovino y caprino (González y col. 2005).

Las lesiones producidas por *M. a. paratuberculosis* se clasificaron en cinco categorías siguiendo los criterios anteriormente mencionados (presencia de lesiones granulomatosas, localización de las mismas, intensidad y distribución de las lesiones, tipos celulares presentes en el infiltrado inflamatorio y presencia de micobacterias):

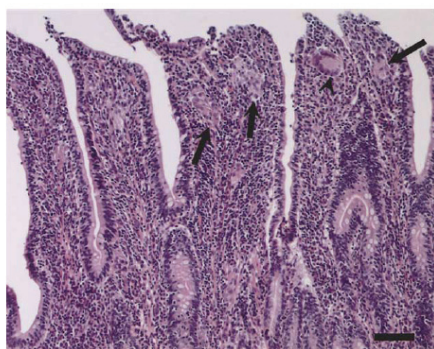
Lesiones focales. Estas lesiones están constituidas por pequeños granulomas que comprenden macrófagos en su interior que presentan un citoplasma pálido, ligeramente espumado, con un núcleo alargado y poca cromatina en su interior. El número de macrófagos por granuloma varía (de 5 a 30) y en el caso de vacas además se han observado células gigantes de Langhans en el mismo granuloma o en localizaciones aisladas (Figura 22). En el caso de ovejas (lesiones del tipo 1) y cabras, este tipo de lesión también se observó en un 24,1 y en un 11,7% respectivamente (Pérez y col. 1996; Corpa y col. 2000). En el caso tanto de ganado vacuno como ovino, este tipo de lesiones se han asociado con una respuesta inmune de tipo celular (Pérez y col. 1996; Balseiro y col. 2003; Kurade y col. 2004).

Figura 22. Lesiones focales en vacas (izquierda) (González y col. 2005) y en cabras (derecha) (Corpa y col. 2000).



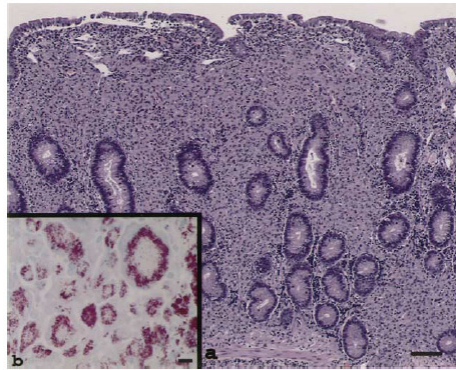
Lesiones multifocales. Este tipo de lesiones, descrita en vacas, se presenta en forma de pequeños granulomas y células gigantes en su interior o en algunos casos en la lámina propia. La diferencia con la lesión focal es que no sólo aparece en el tejido linfoide sino también en la lámina propia. En el intestino delgado, esta lesión se presenta en forma de pequeños granulomas o células de Langhans rodeados de un infiltrado de linfocitos y células plasmáticas, localizados en algunas de las vellosidades intestinales (Figura 23) (González y col. 2005). Este tipo de lesiones fue también descrito en ovejas (tipo 2 y 3a) (Pérez y col. 1996) y se corresponden con las formas “media” y “moderada” de la enfermedad descritas anteriormente en vacuno (Buergelt y col. 1978).

Figura 23. Lesiones multifocales observadas en el íleon. Aquí se observan macrófagos (flechas) y células gigantes (cabeza de la flecha), rodeados por linfocitos y localizados en la zona apical de algunas vellosidades intestinales. Aún así, la morfología y estructura de las vellosidades no está demasiado afectada, observándose incluso vellosidades con la morfología intacta (González y col. 2005).



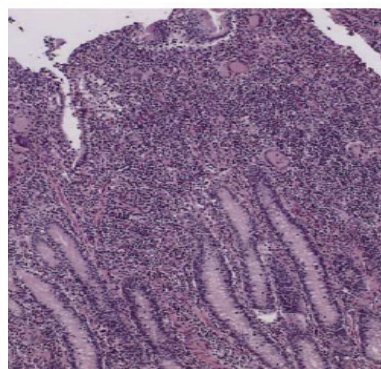
Lesiones multibacilares difusas. Lesión asociada con una enteritis granulomatosa severa en la cual se ven afectados tanto diferentes localizaciones intestinales como linfonodos. En este tipo de lesiones los macrófagos (principal célula inflamatoria) contienen grandes cantidades de organismos ácido-alcohol resistentes y también se observan células epitelioides que se infiltran en la pared intestinal. El tipo de histopatología observada se caracteriza por la fusión frecuente de las vellosidades intestinales y por la presencia de granulomas en el cuerpo de aquellas vellosidades intestinales sin fusionar. En estos casos la mucosa aparece engrosada con linfocitos y células de Langhans en el infiltrado epitelioides. Además, en muchos de los casos las glándulas intestinales presentan debris necrótico en su interior y son normalmente positivas a la tinción de Zielh-Neelsen, indicando la presencia de *M. a. paratuberculosis* en su interior (Figura 24) (Corpa y col. 2000; González y col. 2005). El tipo de lesiones difusa sería comparable con el estado “avanzado” de la enfermedad descrito anteriormente en ganado vacuno (Buergelt y col. 1978). Este tipo de lesiones han sido descritas como las clásicas de paratuberculosis en cabras (Corpa y col. 2000).

Figura 24. Imagen del yeyuno en la que se observa el infiltrado inflamatorio constituido por macrófagos en forma de mosaico y en el que se da un engrosamiento de la mucosa. A su vez se observa la fusión de las vellosidades intestinales y la presencia del contenido ácido-alcohol resistente con la tinción de Zielh-Neelsen en el infiltrado inflamatorio (González y col. 2005).



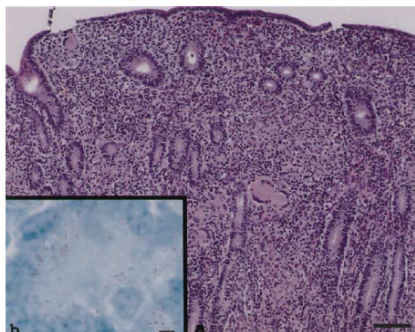
Lesiones linfocíticas difusas (paucibacilares). Este tipo de lesión se caracteriza por la presencia de una enteritis granulomatosa severa y difusa. Los tipos celulares predominantes son diferentes a los observados en las otras lesiones, siendo los linfocitos las principales células inflamatorias que se infiltran hacia la lámina propia y entre éstos también pueden observarse algunos macrófagos y células de Langhans. La arquitectura de la mucosa está alterada y se encuentra un gran infiltrado inflamatorio tanto en la parte basal de la lámina propia como en las vellosidades intestinales. Sin embargo, en la submucosa solo se encuentran células gigantes y pequeños granulomas (Figura 25). En este caso, el número de bacilos ácido-alcohol resistentes es muy reducido e incluso ausente en gran parte de las diferentes secciones intestinales (Corpa y col. 2000; González y col. 2005).

Figura 25. Imagen del íleon en el que se observa un infiltrado inflamatorio constituido principalmente por linfocitos, aunque entre estos también se observa algún macrófago y célula de Langhans (González y col. 2005).



Lesiones intermedias difusas. Las lesiones observadas presentan características tanto de los tipos linfocítico como multibacilar. En este caso las lesiones se caracterizan por un infiltrado formado por abundantes linfocitos y macrófagos fundamentalmente (Corpa y col. 2000; González y col. 2005) (Figura 26).

Figura 26. Íleon con atrofia de las vellosidades intestinales y separación glandular debido a la presencia de un infiltrado constituido por macrófagos y linfocitos (González y col. 2005).



11. Profilaxis, terapia y control de la enfermedad de Johne

11.1. Vacunación en animales

Las vacunas desarrolladas hasta la fecha para la prevención de la enfermedad de Johne o paratuberculosis han sido realizadas a partir de cepas vivas atenuadas, de cepas inactivadas, o de fracciones de *M. a. paratuberculosis* (Saxegaard y Fodstad, 1985; Cocito y col. 1994).

La primera vacuna disponible fue desarrollada por Vallée y Rinjard en 1926 que se produjo a partir de una cepa viva virulenta de *M. a. paratuberculosis* la cual se reconstituyó en parafina líquida y aceite de oliva. Esta vacuna fue diseñada para su inoculación vía subcutánea y se aplicó inicialmente con gran éxito en Francia (Stuart, 1965; Cocito y col. 1994). A continuación, otra cepa viva atenuada de *M. a. paratuberculosis* obtenida tras el subcultivo de la misma en medio libre de micobactina fue empleada para la vacunación de animales en Francia y Reino Unido (Stuart, 1965). En este estudio se concluyó que este tipo de vacuna era capaz de erradicar la enfermedad en un plazo aproximado de cuatro años.

Más adelante se desarrollaron vacunas comerciales entre la que destaca la realizada a partir de una cepa viva atenuada de *M. a. paratuberculosis* (con referencia 316F), reconstituida en un adyuvante oleoso (NeoparasecTM, Lab. Rhone-Mérieux) y la cual fue extensamente empleada en Francia desde su inicial desarrollo. Sin embargo, esta vacuna tenía como principal inconveniente el de la producción de anticuerpos anti-micobacterianos en aquellos animales inoculados subcutáneamente con la vacuna, con lo cual podía dar lugar a la

presentación de reacciones positivas a los ensayos serológicos más comúnmente empleados para el diagnóstico de la enfermedad (Hilbink y West, 1990). Más tardíamente, en otro estudio se empleó esta misma vacuna por vía oral durante el transcurso de 10 semanas, para después proceder en estos animales al desafío un mes más tarde con un aislado clínico de *M. a. paratuberculosis* una vez por semana durante 10 semanas. Como resultado de este trabajo, en las necropsias de los animales desafiados no se observaron diferencias con respecto a las del grupo control, poniendo en evidencia la escasa protección de esta vacuna vía oral frente a una de las cepas patógenas de *M. a. paratuberculosis* (Gilmour y Angus, 1974; Harris y Barletta, 2001). Aunque estos datos, de acuerdo a lo que otros autores postulan, no son fiables ya que la diferenciación entre animales vacunados y no vacunados a nivel de anatomo-patología sólo se debe llevar a cabo transcurridos seis meses o más tras la finalización del último desafío (Stuart, 1965; Juste y col. 1994; Gwozdz y col. 2000).

En la actualidad, otra vacuna comercializada para la enfermedad de Johne o paratuberculosis es la de GudairTM (CZ Veterinaria S.A, España). Esta vacuna se realiza también a partir de la cepa de *M. a. paratuberculosis* 316F inactivada térmicamente y se compone también por un adyuvante de aceite mineral. En un ensayo aplicaron esta vacuna en 400 ovejas en Australia (200 vacunadas y 200 no vacunadas como grupo control) y observaron efectos positivos tras la vacunación como la reducción de la mortalidad a nivel de rebaño del 90% en los animales vacunados con respecto al grupo control y la disminución de los niveles de excreción en heces de *M. a. paratuberculosis* en los animales infectados (hasta del 90%). Sin embargo, en este mismo estudio también se registraron efectos negativos como la presencia de animales vacunados que excretaron elevadas cantidades de *M. a. paratuberculosis* al medio, algunos animales vacunados que presentaron infección subclínica y por último un reducido número de animales del grupo vacunado que murieron debido a la enfermedad y presentaron lesiones multibacilares. Esto pone de manifiesto las precauciones que se han de tener cuenta en lo que respecta al movimiento de animales vacunados a otras zonas de baja prevalencia, con lo que esta vacuna se recomendó como aplicación para el control de la enfermedad en rebaños con alta prevalencia de la enfermedad (Reddacliff y col. 2006).

Finalmente, en otro estudio reciente (Griffin y col. 2009) se comparó la vacuna GudairTM con dos vacunas obtenidas a partir de microorganismos inactivados y vivos atenuados en 35 ovejas por cada tipo de vacuna y 30 ovejas control (analizando a su vez las vías intra-peritoneal y subcutánea para este último tipo de vacuna) reconstituidos en una

formulación lipídica derivada de aceite de planta denominada matriz lipídica-K. En cuanto a las ventajas de las formulaciones lipídicas con respecto a la vacuna de GudairTM, las primeras dieron lugar a una menor reacción inflamatoria en el punto de inoculación, una reducción en la prevalencia de la enfermedad en el rebaño (en comparación con el grupo de animales control) y además se observaron menos lesiones macroscópicas (sobre todo en el grupo de animales a los que se les administró la vacuna intra-peritoneal).

A pesar de estas ventajas, las lesiones microscópicas a nivel histopatológico fueron menores en la vacuna de GudairTM (aunque a nivel de lesiones multibacilares la incidencia fue menor en los animales a los que se les administró la formulación lipídica). En este estudio concluyeron que ninguna de las vacunas o vías de inoculación presentó variaciones en los índices morfométricos (pérdida de peso tras el desafío o la ganancia de peso durante el estadio de infección crónica), por lo que en general, su nivel de impacto en la enfermedad de Johne fue el mismo.

En ganado vacuno también se han hecho diversos estudios recientemente, en uno de ellos se describió que el empleo de una vacuna inactivada en adyuvante oleoso era capaz de reducir la sintomatología clínica en los rebaños infectados y de producir una respuesta estadísticamente significativa frente a *M. a. paratuberculosis* (Platt y col. 2010). También en un estudio realizado con 12 terneros a los que se administró una vacuna inactivada de *M. a. paratuberculosis* y posteriormente se desafiaron con una cepa virulenta de *M. a. paratuberculosis* vía oral no se detectaron reacciones positivas en los ensayos serológicos efectuados y en los cultivos de los tejidos de los animales vacunados se observó una menor cantidad de unidades formadoras de colonias en algunos y en otros ausencia de crecimiento (Sweeney y col. 2009).

En términos generales, en muchos de los trabajos realizados sobre la vacunación a nivel de rebaños se observó que en aquellos en los que se vacunó se produjo una disminución en lo que respecta al número de animales infectados como de aquellos en un estadio de la enfermedad avanzado, además de una reducción en el número de animales excretores y de la cantidad de micobacterias excretadas al medio (Cocito y col. 1994). A pesar de todo esto, la vacunación produce en algunos casos lesiones cutáneas en el punto de inoculación, además de que la inoculación del microorganismo o extractos crudos del mismo induce a una hipersensibilidad retardada y cierta positividad en los ensayos diagnósticos serológicos, dificultando con ello la determinación de la prevalencia real en esos rebaños (Chiodini y col. 1984; Hilbink y West, 1990; Cocito y col. 1994). Además, en un principio se

vio que la vacunación originaba una interferencia diagnóstica con las pruebas del γ -IFN e intradermotuberculinización (IDTB), pruebas de diagnóstico oficiales para la detección de tuberculosis (Kohler y col. 2001; Muskens y col. 2002; Mackintosh y col. 2005). Sin embargo, en un estudio reciente se ha descrito una vacuna de subunidades de la proteína de estrés al calor 70 la cual no interfiere con las pruebas de diagnóstico de tuberculosis. A pesar de esto, se deben de realizar más estudios con una cohorte de animales mayor (es este caso era de 30) para demostrar el espectro de eficacia de esta vacuna y la ausencia de interferencia con las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis (Santema y col. 2009).

11.2. Tratamiento de la enfermedad

En cuanto al tratamiento de la enfermedad de Johne, éste raramente se lleva a cabo o solo de manera excepcional en el caso de animales de compañía o animales de elevado valor genético. Estos tratamientos se deben realizar a diario y solamente palian la enfermedad si suponer una cura para ésta. Además, a pesar de que los signos clínicos de la enfermedad disminuyen en los animales tratados, éstos siguen excretando microorganismos al medio y los productos obtenidos de animales tratados y destinados a consumo humano no son aceptables (Larsen y Vardaman, 1953; Merkal y Larsen, 1973). Los fármacos más comúnmente empleados en el tratamiento de la enfermedad son los agentes antimicobacterianos como la cicloserina, el etambutol, la etionamida, la isoniazida, el ácido paraaminosalicílico, la tiocarlida y los tiosemicarbazones, las fenamidas, la pirizinaamida, etc. Entre los antibióticos clínicamente activos se encuentran los aminoglucósidos (gentamicina, canamicina, neomicina, estreptomina, etc.), la capreomicina, la rifabutina, la rifampicina y la viomicina. Sin embargo, los resultados obtenidos tras la aplicación de estos fármacos en modelos *in vivo* no son equiparables a los obtenidos en modelos *in vitro*, puesto que estas micobacterias en la mayoría de los casos se encuentran inaccesibles ya que se multiplican en el interior de fagocitos y otras células de la mucosa intestinal de las placas de Peyer (Cocito y col. 1994).

Por todo esto, en un estudio reciente (Bull y col. 2009) se ha descrito al agente rodamina (D157070) como una buena alternativa para el tratamiento contra los fenotipos tanto replicativos como latentes de *M. a. paratuberculosis*, aunque los resultados descritos son el resultado de un estudio *in vitro*, por lo que se necesitarían datos de estudios *in vivo* para demostrar la eficacia de este agente en el tratamiento de la enfermedad.

11.3. Estrategias de control

Los programas de control de la enfermedad de Johne se basan en el conocimiento de las vías de infección de *M. a. paratuberculosis*, en la persistencia del microorganismo en el medioambiente y en el desarrollo de métodos para la reducción de la exposición de *M. a. paratuberculosis* en el hábitat animal.

Los requerimientos mínimos para el control de la enfermedad incluyen la identificación de los puntos críticos de transmisión de la enfermedad, el desarrollo de herramientas de muestreo y diagnóstico para la identificación de animales excretores, la mejora de la trazabilidad e identificación de animales de manera individual, la presencia de fuentes con animales de reemplazo libres de la enfermedad, etc. (Kennedy y Benedictus, 2001).

Los datos disponibles hasta la fecha sugieren que estos requisitos se cumplen en la actualidad en el control de la enfermedad en rumiantes domésticos y han llevado a las siguientes conclusiones (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003):

- La principal vía de transmisión es la ruta fecal-oral, pero la transmisión de la enfermedad también se puede dar vía uterina, por el calostro, semen, leche, etc.
- Los rumiantes adultos infectados son la principal fuente de transmisión del microorganismo.
- Aquellos animales que se encuentran en una fase subclínica o clínica de la enfermedad tienen más probabilidades de excretar mayores cargas bacterianas que los que se encuentran infectados en una fase temprana de la enfermedad.
- Los animales jóvenes (menores a 6 meses de edad) son más susceptibles a la enfermedad, pero los animales adultos también se pueden infectar si la carga infecciosa es alta o se mantienen con una exposición al microorganismo prolongada.
- *M. a. paratuberculosis* puede persistir en el agua, estiércol o en otras localizaciones ambientales durante largos períodos de tiempo (períodos de un año o superiores).
- La incorporación de nuevos animales infectados con *M. a. paratuberculosis* en un rebaño es una vía primaria de infección para el nuevo rebaño.
- Las pruebas de diagnóstico disponibles hasta la fecha son adecuados para la detección de animales excretores de manera individual o a nivel de rebaño, pero estos ensayos deben ser aplicables a nivel de rebaño preferiblemente.
- La comunicación de los resultados del ELISA en probabilidades en lugar de resultados

positivos o negativos sería beneficioso para los programas de control e incrementaría el porcentaje de confianza de los ensayos.

- La eliminación de los animales que se encuentran en las fases subclínicas y clínicas de la enfermedad reduciría el número de microorganismos presentes en el medioambiente de un rebaño infectado.
- La separación de los animales recién nacidos tras el parto (antes de la lactancia) interrumpiría una vía de transmisión de la enfermedad importante.
- La prevención de la contaminación fecal del agua, comida y el medioambiente reduciría la probabilidad de transmisión de *M. a. paratuberculosis*.

12. *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y la enfermedad de Crohn

La descripción de la enfermedad de Crohn data de 1932, fecha en la que Burril B. Crohn describió por primera vez la enfermedad en personas como una forma de ileitis granulomatosa crónica (Harris y Barletta, 2001). Los signos clínicos de la enfermedad son la enteralgia, la diarrea y los vómitos, los cuales se manifiestan en forma de remisiones y relapsos. La enfermedad se presenta con una mayor incidencia en individuos de edades comprendidas entre los 16 y los 25 años, aunque también se ha observado (con una incidencia menor) en individuos comprendidos entre los 55 y los 65 años de edad (Chacon y col. 2004).

Durante el transcurso de la enfermedad se ha observado que los órganos comúnmente afectados son el íleon terminal y el ciego, el íleon o el colon, que en la gran mayoría de los casos viene acompañado de procesos de perforación, formación de abscesos, fístulas, constricción y obstrucción intestinal entre otros.

La causa de la enfermedad es desconocida, sin embargo hay diversas hipótesis como la de una respuesta autoinmune aberrante del hospedador a antígenos indefinidos o contra agentes infecciosos incluyendo a *M. a. paratuberculosis*, *E. coli*, una infección vírica crónica, etc. También se han considerado otras posibles etiologías y orígenes como una isquemia crónica y micro-infartación, la presencia de una respuesta anómala a un componente dietético, una respuesta inflamatoria alterada a la microflora intestinal normal, la predisposición genética a la enfermedad (debido a la presencia de SNPs en el gen NOD2), etc.

(Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003; Nacy y Buckley, 2008).

La descripción inicial de *M. a. paratuberculosis* como agente causal de la inflamación crónica del intestino en personas tuvo lugar en 1913 en Glasgow y la llevó a cabo el cirujano T.K. Dalziel (Hermon-Taylor y El-Zaatari, 2004). Sin embargo, debido a la dificultad de aislamiento y detección de este patógeno no es hasta 1984 cuando el Dr. Rod Chiodini y sus colaboradores caracterizaron por primera vez una micobacteria, micobactina-dependiente obtenida de tres pacientes enfermos de Crohn (Chiodini y col. 1984). Los aislados obtenidos de estos pacientes de Crohn eran patógenos para ratones, otros animales de laboratorio y chivos y producían enfermedad granulomatosa en el intestino distal (Chiodini y col. 1984).

Hasta la fecha hay numerosos trabajos que apoyan y otros que ponen en entredicho la hipótesis de *M. a. paratuberculosis* como agente causal de la enfermedad de Crohn. Entre los factores que apoyan la teoría de la existencia de un vínculo entre *M. a. paratuberculosis* y la enfermedad de Crohn se encontrarían (Nacy y Buckley, 2008; Chacon y col. 2004):

- *M. a. paratuberculosis* se caracteriza por causar una enfermedad gastrointestinal severa y terminal en rumiantes, la cual presenta ciertas similitudes con la enfermedad de Crohn tanto a nivel clínico como patológico (Harris y Barletta, 2001; Chacon y col. 2004) (Tablas 11 y 12).

Tabla 11. Características de la enfermedad de Crohn y la enfermedad de Johne (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003).

Signo clínico	Enfermedad de Crohn	Enfermedad de Johne
Fase preclínica		
Síntomas y signos clínicos	Desconocidos	Reducción en la producción láctea
Período de incubación	Desconocidos	Mínimo de 6 meses
Fase clínica		
Presentación de síntomas y signos clínicos	Diarrea crónica, dolor abdominal y pérdida de peso	Diarrea crónica, pelo sin brillo, pérdida de peso y reducción en la producción láctea
<u>Síntomas y signos gastrointestinales</u>		
Diarrea	Crónica (más de tres semanas)	Crónica (no en ovejas)
Sangre en heces (melena)	Infrecuente	Infrecuente
Vómitos	Infrecuente	No
Dolor abdominal	Sí	Desconocido
Obstrucción	Sí	No
<u>Manifestaciones extra-intestinales</u>		
Poliartritis	Sí, pero infrecuente	No
Uveítis	Sí, pero infrecuente	No
Lesiones cutáneas	Sí	No
Amiloidosis	Sí, pero infrecuente	Sí (principalmente en cabras)
Granulomatosis hepática	Sí, pero infrecuente	Sí
Daño renal	Sí, pero infrecuente	Sí (cabras, camélidos, ciervos y primates)
Fase clínica		
Remisión y relapso	Sí	Sí

Tabla 12. Características patológicas de la enfermedad de Crohn y la enfermedad de Johne (Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003).

Característica	Enfermedad de Crohn	Enfermedad de Johne
Localización de la lesión		
Esófago y cavidad oral	Sí	No
Íleon y colon	Sí	Sí (íleon y yeyuno son las localizaciones iniciales más frecuentes)
Linfonodos mesentéricos	Sí	Sí
Recto, ano	Sí	Casos avanzados (no siempre en ovejas)
Participación de diferentes segmentos del intestino	Sí	Sí
Rasgos macroscópicos		
Apariencia macroscópica	Edema en la pared intestinal afectada	Engrosamiento de la pared intestinal (no siempre en ovejas)
Edema parietal	Sí	Sí
Estenosis	Sí	Raramente
Perforación	Sí	Raramente
Fístula	Sí	No
Pseudopólipos	Sí	No
Aspecto de la mucosa	Apariencia en forma de “adoquín”	Ondulada (no siempre en ovejas; rasgo predominante en la forma paucibacilar)
Apariencia microscópica		
Involucración transmural	Sí	Infrecuente
Fibrosis	Sí	No
Agregados linfoides	Sí	Sí (predominante en la forma paucibacilar)
Granuloma	Sí (50-70% de los casos)	Ocasionalmente
Caseificación	No	Normalmente no (varía según especie)
Fisuras	Sí	No
Bacilos ácido-alcohol resistentes	No	Sí (infrecuente o ausente en la forma paucibacilar)

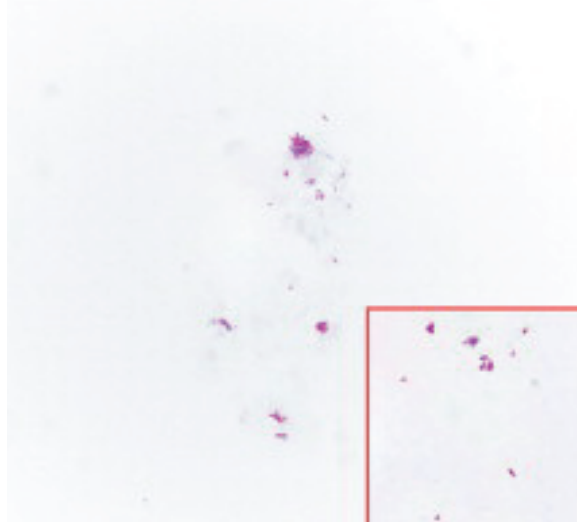
- Dada la gran similitud genética que presentan *M. a. paratuberculosis* y *M. avium* (patógeno oportunista en individuos inmunodeprimidos) y la capacidad patogénica descrita en un amplio rango de hospedadores para ambos agentes, se podría extrapolar que *M. a. paratuberculosis* debe al menos poder actuar como un patógeno oportunista para personas (Chacon y col. 2004).

- *M. a. paratuberculosis* ha sido detectado hasta el momento en leche, queso, carne y agua destinados al consumo humano y por lo tanto estos pueden suponer una posible ruta de exposición de *M. a. paratuberculosis* para el hombre (Corti y Stephan, 2002; Donaghy y col. 2004; Pickup y col. 2005; Clark y col. 2006; Pickup y col. 2006; Abubakar y col. 2007; Jaravata y col. 2007; Alonso-Hearn y col. 2009).

- Los genes asociados con la enfermedad de Crohn sugieren que una respuesta inmune inadecuada a un patógeno intracelular puede ser el principal desencadenante de la enfermedad. *M. a. paratuberculosis* es un patógeno intracelular y parece plausible que esté desencadenando la enfermedad (Ferveda y col. 2007; Parkes y col. 2007).

- *M. a. paratuberculosis* ha sido detectado en tejidos, sangre y leche de pacientes de Crohn mediante técnicas moleculares, histopatológicas y anticuerpos contra antígenos de *M. a. paratuberculosis* (Hulten y col. 2000; Naser y col. 2000; Olsen y col. 2001; Naser y col. 2004; Chamberlin y col. 2007).
- El agente *M. a. paratuberculosis* también ha podido ser observado en los tejidos de pacientes de Crohn mediante la tinción de Zielh-Neelsen (Jeyanathan y col. 2007) (Figura 27).

Figura 27. Tinción de Zielh-Neelsen en el tejido de pacientes de Crohn en el que se observan bacilos de *M. a. paratuberculosis* (Jeyanathan y col. 2007).



- Un trabajo en el que se revisaron todos los estudios en los que se discutía la relación entre *M. a. paratuberculosis* y pacientes enfermos de Crohn acabó estimando que estos pacientes presentaban una probabilidad siete veces mayor de tener *M. a. paratuberculosis* en sus tejidos en comparación con el resto de la población (Feller y col. 2007).

Por otro lado, entre los argumentos que contradicen la hipótesis que sostiene la relación entre *M. a. paratuberculosis* y la enfermedad de Crohn se encuentran los siguientes:

- En un estudio se vio que los ganaderos y el personal más expuesto a *M. a. paratuberculosis* en comparación con otros sectores poblacionales no presentaron mayores tasas de la enfermedad de Crohn que el resto (Jones y col. 2006). Aunque si se ha demostrado que la migración de poblaciones no expuestas a la enfermedad de Crohn hacia zonas de alta prevalencia da lugar a la presentación de una mayor tasa de enfermedad en estos individuos

(Probert y col. 1996). Sin embargo, cabe destacar que Suecia tiene las tasas de prevalencia de la enfermedad de Crohn más altas a pesar de presentar una prevalencia baja de la enfermedad de Johne (Ekblom y col. 1991; Sternberg y Visker, 2003).

- A pesar de las similitudes presentes entre la enfermedad de Crohn y la de Johne, hay alguna diferencia en lo que respecta a la presentación clínica y la patología de ambas (Chiodini, 1989) (Tablas 11 y 12).
- Hasta la fecha no se han realizado estudios sistemáticos en los que se observe un empeoramiento de la condición de los enfermos de Crohn por déficits inmunitarios tal y como es el caso de las infecciones por *M. tuberculosis* (Sartor, 2005).
- En un ensayo clínico controlado, el grupo de pacientes a los que se les sometió a seis meses de terapia antibiótica no mantuvieron una respuesta continua a estos medicamentos y el relapso observado tras dos años de tratamiento fue similar al obtenido en el grupo de pacientes control no tratados (Selby y col. 2007).

Como conclusión cabría decir que el papel de *M. a. paratuberculosis* en el desarrollo de la enfermedad de Crohn está todavía en entredicho y éste sólo se podrá corroborar o desestimar tras la mejora de los métodos de aislamiento y detección de los bacilos de *M. a. paratuberculosis*, la aparición de modelos animales de la enfermedad de Crohn (hasta la fecha únicamente se ha realizado en modelos animales para investigar los aspectos de la enfermedad de Johne), así como la mejora del diseño en ensayos clínicos con agentes quimioterápicos, etc.) (Chacon y col. 2004).

ParaTBtools: Herramientas para el diagnóstico de la paratuberculosis

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enfermedad crónica del tracto gastrointestinal que afecta a un amplio rango de hospedadores, especialmente a rumiantes domésticos, cuyo agente etiológico es *M. a. paratuberculosis*. Esta enfermedad cursa con importantes pérdidas económicas derivadas fundamentalmente de la disminución en la producción láctea además de otros factores (reducción de la vida productiva media, disminución de la fertilidad del animal, etc.). Sin embargo, la determinación de la prevalencia de la enfermedad está dificultada por la reducida sensibilidad de las pruebas diagnósticas y los largos períodos de incubación de *M. a. paratuberculosis*.

A su vez, hay diversas hipótesis que sostienen la implicación de *M. a. paratuberculosis* en la etiología de la enfermedad de Crohn (inflamación crónica del intestino en el hombre), indicando con ello el posible potencial zoonótico de este microorganismo.

Este compendio de factores llevó a la concesión del proyecto europeo “ParaTBtools: desarrollo de herramientas para la detección de paratuberculosis en el ganado, *M. a. paratuberculosis* en los alimentos y evaluación del riesgo para el hombre”, con la participación de 28 instituciones distribuidas en siete países europeos. Este proyecto está basado en cinco áreas temáticas: estandarización, armonización y optimización de técnicas de laboratorio; estudio de la interacción hospedador-patógeno durante la infección; inactivación del agente en leche y productos lácteos; control y riesgo de la enfermedad; y estudio y caracterización de la relación entre pacientes de Crohn y *M. a. paratuberculosis*.

Por último, los resultados derivados de las distintas áreas temáticas serán divulgados conjuntamente a la comunidad científica.

ParaTBtools: Tools for the diagnostic of paratuberculosis

Paratuberculosis or Johne's disease is a chronic disease located in the gastrointestinal tract that affects a broad range of hosts, especially domestic ruminants. The ethiological agent is *M. a. paratuberculosis*. This disease causes significant economic losses, mainly derived from the reduction in milk production among other factors (decrease in average productivity, fertility reduction, etc.). However, the estimated prevalence is hampered by the limited sensitivity of diagnostic tests and the long incubation periods of *M. a. paratuberculosis*.

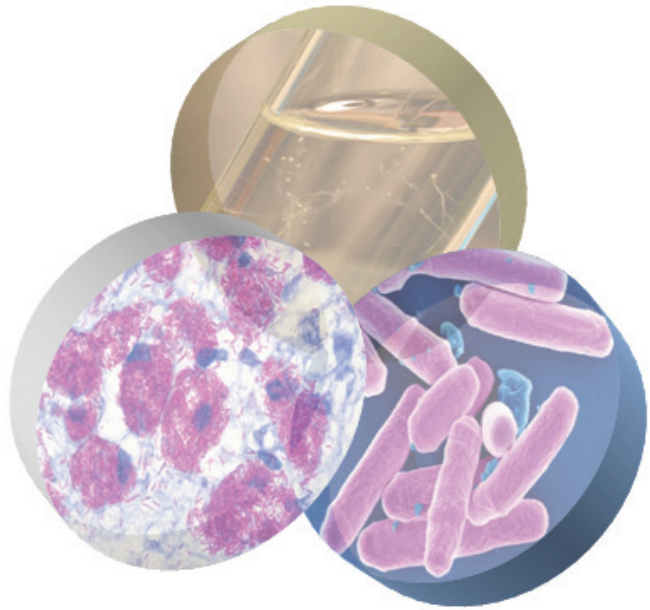
Additionally, there are several hypotheses that support the implication of *M. a. paratuberculosis* in the etiology of Crohn's disease (a chronic inflammation of the human intestine); thus indicating the possible zoonotic potential of this microorganism.

This compilation of factors derived in the European project "ParaTBtools: development of tools for the detection of paratuberculosis in livestock, *M. a. paratuberculosis* in food and risk evaluation for humans", with the participation of 28 institutions throughout seven European countries. This project is based on five thematic areas: standardization, harmonization and optimization of laboratory techniques; investigation of host-pathogen interaction during infection; agent inactivation in milk and dairy products; control and risk assessment of the disease; and study and characterization of the relationship between Crohn's disease patients and *M. a. paratuberculosis*.

To sum up, the results obtained in the different thematic areas will be divulged to the scientific community.

Objetivos

Objectives



“Las cosas se deben hacer todo lo simples que se puedan pero no más simplificadas”

“Things should be made as simple as possible but not any simpler”

Albert Einstein, Premio Nobel de Física en 1921

M. a. paratuberculosis, agente etiológico de la enfermedad de Johne ó paratuberculosis es un microorganismo de crecimiento lento que además presenta requerimientos de cultivo especiales, siendo en ocasiones no cultivable.

Por lo tanto, y siguiendo la línea de investigación llevada a cabo anteriormente en el servicio de micobacterias del centro VISAVET de la Universidad Complutense de Madrid, nos marcamos los siguientes objetivos:

1. El desarrollo y puesta a punto de un método que permitiera la detección e identificación diferencial de los tres tipos de cepas de *M. a. paratuberculosis* (tipos I, II y III), descritos hasta ese momento. Este objetivo se aborda en el capítulo II.
2. Estudio y mejora de una metodología basada en unidades de repetición, como unidades repetitivas intergénicas dispersas en micobacterias (MIRU) y repeticiones en tándem de número variable (VNTR) para la subtipificación molecular de *M. a. paratuberculosis* y otros miembros del complejo *Mycobacterium avium* (MAC). Este objetivo se detalla en el capítulo III.
3. A partir del desarrollo de las técnicas de cuantificación, nos propusimos desarrollar una metodología para la tipificación molecular rápida de los tres tipos de cepas de *M. a. paratuberculosis* (I, II y III) y otros miembros de MAC. Este objetivo se recoge en el capítulo IV.
4. Descripción de las diferencias a nivel genómico de los tres tipos de cepas de *M. a. paratuberculosis* (I, II y III) mediante análisis por microarray. En base a estas regiones específicas, puesta a punto de métodos de PCR para una diferenciación rápida entre las cepas. Este objetivo se resume en el capítulo V.
5. Identificación, descripción y caracterización de cepas de *M. a. paratuberculosis* de tipo II obtenidas de cabras de la Comunidad de Madrid. Estudiando la significación epidemiológica de las mismas. Este objetivo se aborda en el capítulo V.

M. a. paratuberculosis, ethiological agent of Johne's disease or paratuberculosis is a slow-growing microorganism that presents specific culture requirements, which sometimes is non-cultivable.

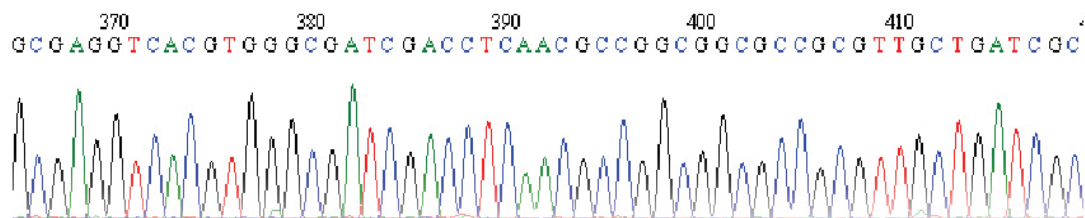
Therefore, in this thesis and in continuation of previous research carried out in the *Mycobacteria* group (VISAVET), we established the following objectives:

1. Development and optimization of a method capable of differentiating the three types of *M. a. paratuberculosis* (types I, II and III) currently described. This objective is explained in chapter II.
2. Study and improvement of the methodology based on mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) and variable number tandem repeats (VNTR) to subtype *M. a. paratuberculosis* isolates and other members of the *Mycobacterium avium* complex (MAC). This objective is described in chapter III.
3. After the development of quantification techniques, we decided to apply these new rapid molecular tools to the characterization of the three types of *M. a. paratuberculosis* (I, II y III) and other members of MAC. This objective is explained in chapter IV.
4. Description of genomic differences present among the three types of *M. a. paratuberculosis* (I, II y III) strains by microarray analysis. Based on these specific regions, we optimized PCR methods for the rapid identification of these strains. This objective is summarized in chapter V.
5. Identification, description and characterization of type II strains of *M. a. paratuberculosis* obtained from goats from central Spain. Study of the epidemiology of these *M. a. paratuberculosis* strains. This objective is expounded in chapter V.

Capítulo II/Chapter II

Descripción de polimorfismos de nucleótido único específicos de cada tipo de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (I, II y III).

Description of single nucleotide polymorphisms, specific for each type of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (I, II and III).



Descripción de polimorfismos de nucleótido único, específicos de cada tipo de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (I, II y III)

La técnica de caracterización de secuencias de multiloci (*Multilocus Sequence Typing*, MLST) está basada en el análisis de las secuencias de múltiples genes de expresión constitutiva (*house-keeping genes*) (Maiden y col. 1998). Esta técnica se ha empleado en microorganismos como *Neisseria meningitidis* (Feil y col., 1999; Yakubu y col. 1999; Nicolas y col. 2000), *Staphylococcus aureus* (Enright y col. 2001), *Streptococcus pyogenes* (Enright y col. 2001; Meisal y col. 2010), *Campylobacter jejunii* (Dingle y col. 2001), *Clostridium difficile* (Griffiths y col. 2010) entre otras. Las diferencias entre las secuencias se encuentran a nivel de nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) y estas diferencias se han descrito como responsables de la presencia de ciertos fenotipos en *M. tuberculosis* (Collins y col 1995).

Durante el transcurso de la tesis hemos desarrollado técnicas de PCR dirigidas a genes diana, tanto de expresión constitutiva como de virulencia y a secuencias diana con el fin de evidenciar diferencias entre los tres tipos de cepas de *M. a. paratuberculosis*. Así, hemos analizado los siguientes genes y secuencias: *ahpC* (peroxiredoxina): 589 pb; *dnaJ* (chaperona): 1180 pb; *inh-A* (reductasa): 812 pb; *katG* (catalasa-peroxidasa): 2247 pb; subunidad A de la girasa (*gyrA*): 2521 bp; subunidad B de la girasa (*gyrB*): 2035 pb; *hsp65* (proteína de estrés al calor): 1626 pb; *IS900* (secuencia de inserción): 1450 pb; MAP1506 (gen de la familia PPE): 1224 pb; *mbtG* (monooxigenasa): 1288 pb; *murI* (glutamato racemasa): 829 pb; *oxyR* (estrés oxidativo): 981 pb; *PhoP* (sistema regulador de dos componentes): 720 pb; *PhoR* (sistema regulador de dos componentes): 1437 pb; *sod-A* (superóxido dismutasa): 625 pb; *thrB* (biosíntesis de treonina): 949 pb y *tpx* (tiol peroxidasa): 495 pb.

Cuando analizamos las secuencias obtenidas de los genes estudiados únicamente encontramos SNPs específicos para cada una de las cepas de *M. a. paratuberculosis* en el caso de los genes *gyrA*, *gyrB*, *inh-A*, IS900 y MAP1506. Sin embargo, otros genes [*katG* (1292 pb), *mbtG* (882 pb), *PhoP* (505 pb) y *sod-A* (397 pb)] presentaron SNPs que diferenciaban entre las cepas del tipo II de las del tipo I y III.

En el primer y segundo estudio, el análisis de los genes *gyrA*, *gyrB* e *inh-A* en un panel de aislados de *M. a. paratuberculosis* de los tipos I, II y III detectó SNPs específicos de cada uno de los tipos. En base a estos resultados se desarrolló una PCR y posterior análisis de restricción enzimática para discriminar entre los aislados de los tipos I y III. La aplicación de esta técnica sería la única estrategia plausible en la caracterización de las cepas que no presenten crecimiento suficiente para la realización de otras técnicas moleculares tradicionales como PFGE e IS900-RFLP. El análisis de la secuencia de los genes *gyrA* y *gyrB* mostró SNPs en las posiciones 868, 1653, 1822 y 1986 en el primero y 108, 264, 494, 1353 y 1626 pb en el segundo. También en el gen *inh-A* se encontraron dos SNPs en las posiciones 224 y 228 del gen.

Los SNPs presentes en las posiciones 1626 del gen *gyrB* y 224 del gen *inh-A* fueron específicos para las cepas de *M. a. paratuberculosis* del tipo III y constituyeron secuencias diana para las enzimas de restricción *Hyp188III* y *SimI*. Los perfiles de restricción de las cepas tipo III fueron claros y distinguibles de los del tipo I en ambos genes. Esta técnica, se caracteriza por ser una técnica molecular rápida y útil en lo que respecta a la diferenciación de estos dos grupos.

Además, los tipos I y III de *M. a. paratuberculosis* presentan una tasa de crecimiento similar (más lenta que los de tipo II) y una clara proximidad genética. Ambas características determinan que éstos sólo sean distinguibles mediante técnicas moleculares tradicionales, las cuales son difícilmente aplicables en la mayoría de estos aislados por la falta de crecimiento necesario para la realización de las mismas. Por lo tanto, los polimorfismos encontrados en estos genes constituyen nuevos loci para la diferenciación de los aislados de *M. a. paratuberculosis* representantes de estos dos tipos.

Finalmente, en el último estudio empleamos la secuencia de inserción IS900, elegida en la actualidad como diana para la identificación de *M. a. paratuberculosis*. Estudios precedentes a este revelaron la presencia de SNPs dentro de la secuencia de inserción IS900. En nuestro trabajo, en el cual se analizaron las secuencias IS900 en una colección de aislados de *M. a. paratuberculosis* de los tipos I, II y III se hallaron polimorfismos adicionales

conservados y específicos para cada uno de los tipos. Estos polimorfismos se podrían emplear como otra herramienta de diagnóstico con fines epidemiológicos para la diferenciación de los distintos tipos de *M. a. paratuberculosis*.

Description of single nucleotide polymorphisms, specific for each type of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (I, II and III)

Multilocus sequence typing (MLST) is based on the analysis of the sequences of multiple house-keeping genes (Maiden et al. 1998). This technique has been used in microorganisms such as *Neisseria meningitidis* (Feil et al., 1999; Yakubu et al. 1999; Nicolas et al. 2000), *Staphylococcus aureus* (Enright et al. 2001), *Streptococcus pyogenes* (Enright et al. 2001; Meisal et al. 2010), *Campylobacter jejunii* (Dingle et al. 2001) and *Clostridium difficile* (Griffiths et al. 2010) among others. The differences among sequences are found at the nucleotide level (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNPs). These SNPs are changes at one base that occur in the DNA sequence and they have been described to be responsible for the presence of certain phenotypes in *M. tuberculosis* (Collins et al. 1995).

During the course of this thesis we have designed and developed PCR techniques directed to house-keeping, virulence genes and target sequences aimed to show differences between the sequences of the three types of *M. a. paratuberculosis*. Thus, we have analyzed the following genes and sequences: *ahpC* (peroxiredoxin): 589 bp; *dnaJ* (chaperone): 1.180 bp; *katG* (catalase-peroxidase): 2247 bp; subunit A of the gyrase (*gyrA*): 2.521 bp; subunit B of the gyrase (*gyrB*): 2.035 bp; *inh-A* (reductase): 812 bp; IS900 (insertion sequence): 1.450 bp; MAP1506 (PPE family gene): 1224 bp; *mbtG* (monooxygenase): 1288 bp; *murI* (glutamate racemase): 829 bp; *oxyR* (oxidative stress): 981 bp; *PhoP* (two-component regulatory system): 720 bp; *PhoR* (two-component regulatory system): 1.437 bp; *sod-A* (superoxide dismutase): 625 bp; *thrB* (threonine biosynthesis): 949 bp and *tpx* (thiol peroxidase): 495 bp.

From the results obtained we only found specific SNPs for each of the *M. a. paratuberculosis* types in genes *gyrA*, *gyrB*, *inh-A*, IS900 and MAP1506. However, other genes [*katG* (1292 bp), *mbiG* (882 bp), *PhoP* (505 bp) and *sod-A* (397 bp)] revealed SNPs that differentiated type II strains from those of types I and III.

In the first and the second study, the analysis of *gyrA*, *gyrB* and *inh-A* genes of a panel of *M. a. paratuberculosis* isolates from types I, II, and III detected type specific-SNPs. Based on these results, we developed a PCR and restriction enzyme analysis to distinguish type I and III isolates. The application of this technique would be the unique strategy to characterize these strains when there is not enough bacterial growth to perform PFGE and RFLP-IS900. The analysis of the sequences of *gyrA* and *gyrB* genes showed SNPs at positions 868, 1653, 1822 and 1986 in the former and 108, 264, 494, 1353 and 1626 bp in the latter. Also *inh-A* gene revealed two SNPs at positions 224 and 228 of the gene.

The SNPs at positions 1.626 of the *gyrB* gene and 224 of the gene *inh-A* were specific for *M. a. paratuberculosis* type III isolates and represented target sequences for the enzymes *Hpy188III* and *SinI*. The restriction profiles of type III isolates were clear and distinguishable from those of type I. This technique is a rapid molecular tool that could be applied for the differentiation of these two groups.

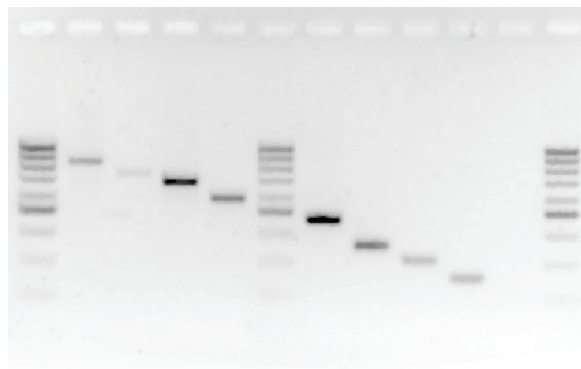
These strains show a similar growth rate (slower than in type II) and a clear genetic closeness. These characteristics require the use of traditional molecular techniques to distinguish between both types. These methods are not applicable for the majority of the isolates, which fail to yield enough growth. Therefore, the polymorphisms found at this gene represent a valuable target for the differentiation of these two types of *M. a. paratuberculosis*.

In the last study, we analyzed the insertion sequence IS900, which is used as a target for the identification of *M. a. paratuberculosis*. Previous reports have revealed SNPs within IS900. In our study, where we analyzed the IS900 sequences of a panel of isolates representing *M. a. paratuberculosis* strain types I, II, and III we described additional conserved type-specific polymorphisms that could be utilized as another tool for diagnostic and epidemiological purposes in the differentiation of *M. a. paratuberculosis* types.

Capítulo III/Chapter III

Caracterización molecular de aislados de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* tipo II y III mediante una combinación de loci MIRU-VNTR.

Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* types I and III by a combination of MIRU-VNTR loci.



Caracterización molecular de aislados de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* tipo II y III mediante una combinación de loci MIRU-VNTR

En el genoma bacteriano se encuentran secuencias de ADN repetidas en forma de tándem que se denominan repeticiones en tándem de número variable (*variable number tandem repeats*, VNTR) o regiones hipervariables (*hypervariable regions*, HVR) (Jeffreys y col. 1985; Supply y col. 2000). Estas regiones de repeticiones de número variable se diferencian en cuanto al número de copias, que varían entre los diferentes individuos, diferencias que se detectan mediante una PCR en la que los oligonucleótidos están dirigidos a las regiones adyacentes (van Belkum y col. 1998; Keim y col. 2000).

Dentro de estas secuencias de ADN repetidas se clasifican las unidades repetitivas intergénicas dispersas de micobacterias (*Mycobacterial interspersed repetitive units*, MIRU), que a su vez se dividen en tres grupos en base a su secuencia, organización y longitud (entre 46 y 101 pb) y que se describieron por primera vez en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (Supply y col. 1997).

La tipificación molecular mediante MIRU-VNTR constituye una técnica que ha sido recientemente aplicada para la caracterización molecular de miembros del complejo *Mycobacterium avium* (MAC).

Por todo esto, el objetivo del primer estudio fue el de examinar la variabilidad genética presente en una colección de aislados españoles de *M. a. paratuberculosis* con una

combinación de loci MIRU-VNTR. Para ello, analizamos seis loci MIRU-VNTR [MIRU-2, MIRU-3, VNTR-25, VNTR-32, VNTR-292 y VNTR-259 (descrito en este estudio)] en 70 aislados de *M. a. paratuberculosis* de los tipos II y III obtenidos de 22 localidades españolas a lo largo de un período de nueve años (1998-2007).

La combinación de cinco loci (MIRU-2, MIRU-3, VNTR-25, VNTR-32 y VNTR-259) permitió la diferenciación de los aislados en 12 perfiles alélicos diferentes con un índice de discriminación de Hunter y Gaston (HGDI) de 0,84. Además, obtuvimos patrones de MIRU-VNTR únicos para cada uno de los tipos de *M. a. paratuberculosis* analizados (II y III) y otros relacionados con determinados hospedadores o restringidos a ciertas áreas geográficas.

Por lo tanto, este método de MIRU-VNTR podría constituir una herramienta de subtipificación molecular rápida útil en el estudio de la epidemiología de la enfermedad de Johne.

En el segundo estudio, se analizaron los aislados de *M. a. avium* obtenidos de 14 aves rapaces de Mallorca (Islas Baleares). Entre ellos se incluyeron 12 cernícalos comunes (prevalencia en esta especie del 4%), un autillo americano (1,7%) y un autillo europeo (0,9%), todos ellos presentando nódulos blanco-amarillentos puntiformes y de 1 cm de diámetro en diversos órganos, principalmente hígado, bazo e intestino. Los órganos afectados se sometieron a bacteriología e identificación molecular mediante PCR y en todos los casos la infección por *M. a. avium* fue confirmada. Las prevalencias observadas son similares a las descritas previamente en Holanda, aunque la prevalencia detectada en este estudio es probablemente mayor a la descrita, ya que sólo se cultivaron aves con lesiones macroscópicas.

Además, se realizó la caracterización molecular mediante seis loci MIRU-VNTR (MIRU-1, MIRU-2, MIRU-3, MIRU-4, VNTR-25 y VNTR-32) para la subtipificación de los aislados y la demostración de la posible existencia de relaciones epidemiológicas entre ellos.

Como resultado se identificaron seis genotipos diferentes, lo que podría ser indicativo de una infección multifocal. Sin embargo, no se observó agregación temporal o espacial asociada con la presencia de aves positivas o con la obtención de perfiles alélicos de MIRU-VNTR diferentes. El origen de la infección más plausible podría ser el agua o la comida, aunque el reservorio de micobacterias todavía es desconocido.

Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* types I and III by a combination of MIRU-VNTR loci

DNA sequences repeated in tandems can be found in the bacterial genome and they are named variable number tandem repeats (VNTR) or hypervariable regions (HVR) (Jeffreys et al. 1985; Supply et al. 2000). These VNTR regions vary in the number of copies, which are different between individuals and they are detected by a PCR where the oligonucleotides are located in the flanking regions (van Belkum et al. 1998; Keim et al. 2000).

Included within this repeated DNA sequences are the mycobacterial interspersed repetitive units or MIRU. These MIRU are classified into three groups (I to III) on the basis of its sequence, organization and length (between 46 and 101 bp) and were first described in the genome of *M. tuberculosis* H37Rv (Supply et al. 1997). MIRU-VNTR is a useful technique that has been recently applied to characterize members of MAC.

The aim of the first study was to examine the genetic variability among a collection of Spanish *M. a. paratuberculosis* isolates with a combination of MIRU–VNTR loci. For this purpose we tested six MIRU–VNTR loci (MIRU-2, MIRU-3, VNTR-25, VNTR-32, VNTR-292 and VNTR-259) in 70 *M. a. paratuberculosis* isolates of Types II and III that were obtained from 22 Spanish localities during a nine-year period (1998–2007). The combination of five loci [MIRU-2, MIRU-3, VNTR-25, VNTR-32 and VNTR-259 (described in our study)] enabled the differentiation of 12 allelic profiles, with a resulting Hunter and Gaston discriminatory index (HGDI) of 0.84. Moreover, we obtained MIRU–VNTR patterns that

were unique for each of the *M. a. paratuberculosis* types analyzed (II and III) and other patterns were host-related or restricted to geographic areas. Therefore, this MIRU–VNTR approach could be a useful subtyping molecular tool in order to get a better sense of the epidemiology of Johne’s disease.

In the second study, 14 *M. a. avium* isolates obtained from raptors from Majorca (Balearic Islands, Spain) were analyzed. They were obtained from 12 kestrels (prevalence in this species, 4%), one long-eared owl (1.7%) and one scops owl (0.9%), all the birds presenting white-yellowish nodules from pinpoint size to 1 cm in diameter in diverse organs, mainly in the liver, spleen and intestine. Affected organs were subjected to bacteriology and molecular identification by PCR and, in all cases, infection with *M. a. avium* was confirmed. The observed prevalences are similar to those previously observed in Holland, although the current prevalence detected in this study is likely to be higher than the one reported because only birds with gross lesions were subjected to culture.

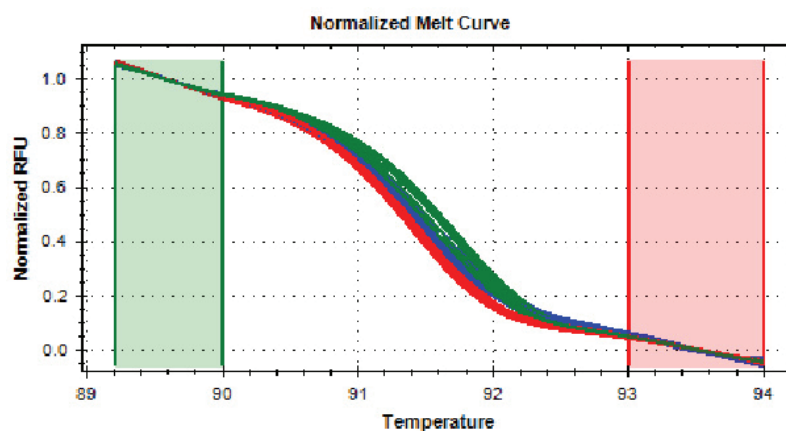
Further molecular characterization by MIRU-VNTR with a set of six loci (MIRU-1, MIRU-2, MIRU-3, MIRU-4, VNTR-25 and VNTR-32) was used to subtype the isolates in order to show the existence of possible epidemiological links.

Six different genotypes were found, which points to an infection from multiple foci. No temporal or geographical aggregation of the cases was observed to be associated with the presence of positive birds or with the different MIRU-VNTR allelic profiles. The most feasible origin might be water or food sources, although the reservoir of mycobacteria remains unknown.

Capítulo IV/Chapter IV

Identificación rápida de los miembros del complejo *Mycobacterium avium* mediante PCR en tiempo real y análisis de curvas de fusión de alta resolución.

Rapid identification of members of the *Mycobacterium avium* complex by real time PCR and high resolution melt analysis.



Identificación rápida de los miembros del complejo *Mycobacterium avium* mediante PCR en tiempo real y análisis de curvas de fusión de alta resolución

La técnica del análisis de las curvas de disociación de alta resolución (*High resolution melt analysis*, HRM) se basa en la interpretación de las curvas de disociación generadas tras la amplificación del gen o secuencia diana mediante PCR en tiempo real. Para ello se emplean colorantes intercalantes de alta afinidad por el ADN de doble cadena y que solo dan fluorescencia mientras el ADN se mantenga en este estado (Evagreen, LC-Green, Syto9, etc.).

Una vez amplificado el gen diana en el que se encuentran las mutaciones puntuales de interés mediante una PCR en tiempo real en el que se emplean colorantes intercalantes, se produce un incremento de temperatura, incremento durante el cual el ADN pasa de un estado en forma de doble cadena a un estado de cadena simple. Durante este proceso de desnaturalización del ADN se produce la liberación del colorante intercalante y la fluorescencia disminuye a medida que este ADN cambia de estado. De esta manera, a medida que aumenta la temperatura, el colorante es liberado de la doble cadena de ADN y la señal luminosa producida es cuantificada por el aparato de PCR en tiempo real.

En el primer estudio, se describe la aplicación de esta técnica en la identificación de 47 aislados de *M. a. paratuberculosis* de los tipos I, II y III. Este método de HRM se basó en las variaciones descritas en las secuencias de nucleótidos del gen MAP1506, gen miembro de la familia PPE (Prolina-Prolina-Ácido glutámico) que presentaba diferencias específicas para cada uno de los tipos (Griffiths y col. 2008; MacKenzie y col. 2009).

Por otro lado, algunos de los miembros del complejo *Mycobacterium avium* (MAC), *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare* son patógenos humanos reconocidos para pacientes tanto inmunocomprometidos como inmunocompetentes y los métodos moleculares actuales disponibles para el genotipado de los miembros del complejo pueden llegar a ser costosos además de difíciles.

En el segundo estudio, describimos por primera vez la aplicación de HRM para la diferenciación entre miembros del complejo dirigido al gen MAP1505 (MACPPE24), perteneciente a la familia PPE (Prolina-Prolina-Ácido glutámico) (MacKenzie y col. 2009). Para la optimización de esta técnica se emplearon cepas de referencia de MAC. Posteriormente, este método de PCR en tiempo real y HRM se aplicó para la diferenciación de 10 aislados de *M. a. hominissuis* de la cepa de referencia de *M. intracellulare*.

Rapid identification of members of the *Mycobacterium avium* complex by real time PCR and high resolution melt analysis

High resolution melt analysis (HRM) is based on the interpretation of the melting curves generated after amplification of a target gene or sequence by real time PCR. For this, intercalating dyes with high affinity for double stranded DNA are used (Evagreen, LC-Green, Syto9, etc.). These dyes fluoresce while DNA is double stranded.

After amplification by real time PCR of the target gene with the mutations of interest, a temperature increase is produced and double stranded DNA becomes single stranded. Thus, during the DNA melting process while temperature increases the dye is released from the double stranded DNA and the fluorescent signal produced is measured by the real time PCR machine.

In the first study, we describe the application of this technique in 47 isolates of *M. a. paratuberculosis* types I, II and III based on type-specific nucleotide sequences described in the MAP1506 gene, member of the PPE gene family (Proline-Proline-Glutamic acid) (Griffiths y col. 2008; MacKenzie y col. 2009).

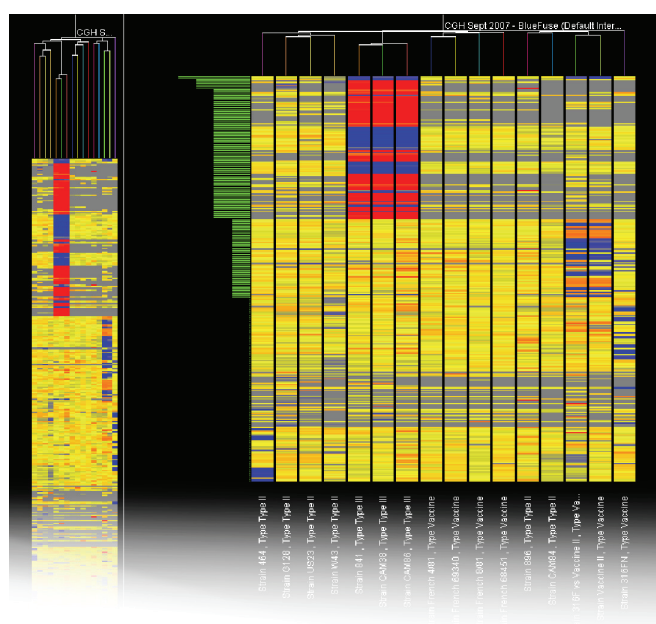
On the other hand, some of the members of the *Mycobacterium avium* complex (MAC), *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* are recognized as human pathogens in both immunocompromised and immunocompetent patients. The current molecular methods that are available to genotype the members of the complex can be both expensive and technically demanding.

In the second report, we describe for the first time the application of HRM approach to differentiate between the complex members by targeting the gene MAP1505 (MACPPE24), a member of the PPE (Pro-Pro-Glu) gene family (MacKenzie et al. 2009). For this purpose, reference strains of MAC were used to optimize the technique. Then, this real time PCR-HRM approach was used to distinguish 10 *M. a. hominisuis* field isolates from the *M. intracellulare* reference strain.

Capítulo V/Chapter V

Descripción de diferencias estables y variables en el genoma de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mediante análisis por microarray.

Description of stable and variable differences in the genome of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by microarray analysis.



Descripción de diferencias estables y variables en el genoma de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mediante análisis por microarray

Los microarrays están constituidos por sondas de ADN que se encuentran inmovilizadas en una superficie sólida. Estas sondas se hibridan con un ADN diana y otro ADN control que a su vez se encuentran hibridados fluorescentemente con dos cromógenos diferentes, comúnmente Cy3 y Cy5. La fluorescencia originada es captada, escaneada y posteriormente procesada mediante el análisis de la imagen generada y un software específico (Gabig y Wegrzyn, 2001; Chaudhuri y col. 2005; Ehrenreich y col. 2006; Jaluria y col. 2007).

En nuestro primer estudio, con el fin de investigar las posibles diferencias genómicas presentes entre los tres grupos de cepas de *M. a. paratuberculosis*, se empleó la técnica de hibridación genómica comparada (HGC) con un microarray de oligonucleótidos 60-pb (designado como microarray MAPAC) basado en los genomas combinados de *M. a. paratuberculosis* (cepa K-10) y *M. a. hominissuis* (cepa 104) que había sido previamente diseñado y validado. En un panel de cepas de *M. a. paratuberculosis* previamente caracterizadas el microarray MAPAC fue capaz de identificar un conjunto de fragmentos polimórficos largos (LSPs) para cada uno de los grupos de *M. a. paratuberculosis*. Se observó que las cepas de tipo II de *M. a. paratuberculosis* contenían un complemento genómico menor que los tipos I y III, los cuales presentaron un grupo de regiones genómicas comunes a *M. a. hominissuis* 104. Seguidamente, se diseñaron PCR específicas para los genes comprendidos dentro de los LSPs que diferenciaron los tipos de *M. a. paratuberculosis* y se emplearon para el análisis de un

panel de cepas de *M. a. paratuberculosis* más extenso (n=78). El análisis de inserciones/deleciones de la región INDEL12 mostró procesos de delección, causantes de la reducción de genes de entrada a células mamíferas en las cepas del tipo II de *M. a. paratuberculosis*, con la consiguiente alteración además de la codificación de una proteína inmunógena (MPT64), asociada con la persistencia y la formación de granulomas. El análisis de los datos de MAPAC también identificó variaciones en las señales de diferentes regiones genómicas, denominadas islas genómicas variables (vGIs), indicativas de procesos de duplicaciones/deleciones transitorios. Estas vGIs estaban constituidas por un porcentaje en GC significativamente menor y estaban flanqueadas por secuencias de inserción, integrasas o repeticiones invertidas de secuencia corta. Mediante PCR cuantitativa se demostró que la variación en las señales de estas vGI podría estar asociada a la tasa de crecimiento y morfología de las colonias.

En nuestro segundo estudio empleamos la técnica de microarray para investigar los mecanismos de patogenicidad de *M. a. paratuberculosis* mediante el análisis transcriptómico de la cepa control, con especial atención a los genes de entrada a células mamíferas (*mce*). Estos genes se encuentran altamente conservados en las micobacterias patógenas y están asociados con la virulencia y patogénesis de las mismas. Sin embargo hasta el momento, los genes *mce* en *M. a. paratuberculosis* no han sido ampliamente estudiados y se desconocen los mecanismos que regulan estos operones. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue el de investigar los mecanismos de patogenicidad empleados por *M. a. paratuberculosis* durante la entrada celular a diferentes hospedadores, con especial atención a los operones de los genes *mce*.

Mediante la técnica de HGC con el microarray MAPAC se caracterizó una cepa variante de *M. a. paratuberculosis* tipo II con una delección de 16 Kb. Esta delección comprendía el operón *mce7_1*, genes asociados a *mce*, miembros de las familias PE/PPE y un regulador transcripcional. La delección estaba presente en un grupo de aislados de *M. a. paratuberculosis* relacionados epidemiológicamente y asociados con una forma de presentación paucibacilar en cabras. El análisis mediante PCR de un panel de 99 aislados de *M. a. paratuberculosis*, obtenidos de 20 rebaños caprinos y vacunos, identificó 53 aislados de *M. a. paratuberculosis* de cuatro rebaños epidemiológicamente relacionados que contenían esta delección de 16 Kb.

El estudio post-mortem y la histopatología en un número reducido de las cabras infectadas con esta cepa había demostrado la presencia de una infiltración de moderada a

severa de macrófagos (con bacilos Ziehl-Neelsen positivos en su citoplasma) y linfocitos, asociada con una presentación de la enfermedad paucibacilar.

Estudios comparativos de invasión *in vitro* en diferentes líneas celulares (THP-1, CACO-2, BOMAC y MOCL-4) demostraron diferencias significativas en lo que respecta a la viabilidad intracelular entre las cepas de *M. a. paratuberculosis* control y las variantes de *M. a. paratuberculosis* con la delección. El análisis de los perfiles transcriptómicos diferenciales de la cepa control tipo II de *M. a. paratuberculosis* tras la entrada celular en las líneas THP-1 y MOCL-4 demostró diferencias significativas en la expresión de diferentes genes PE/PPE y operones *mce*, incluyendo la súper-regulación del operón *mce7_1* y genes adyacentes comprendidos dentro de la región de 16 Kb delecionada. Estos datos sugieren una posible implicación de esta región en los mecanismos de patogenicidad intracelular de *M. a. paratuberculosis*.

Description of stable and variable differences in the genome of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by microarray analysis

Microarrays are composed by DNA probes that are attached to a solid matrix surface. These probes are hybridized with a test and control DNA that are labeled with fluorescent dyes, Cy3 and Cy5. Fluorescence is then captured, scanned and processed with specific software (Gabig and Wegrzyn, 2001; Chaudhuri et al. 2005; Ehrenreich et al. 2006; Jaluria et al. 2007).

In our first study, to further investigate the genomic differences present between the three types of *M. a. paratuberculosis* strains we used genomic hybridization comparison (GHC) with a 60-mer oligonucleotide microarray (designated the MAPAC array), based on the combined genomes of *M. a. paratuberculosis* (strain K-10) and *M. a. hominissuis* (strain 104), which had been designed and validated. In a panel of defined *M. a. paratuberculosis* strains, the MAPAC array was able to identify a set of large sequence polymorphisms (LSPs) for each of the three major *M. a. paratuberculosis* types. *M. a. paratuberculosis* type II strains contained a smaller genomic complement than types I and III, which included a set of genomic regions also found in *M. a. hominissuis* 104. Specific PCRs for genes within LSPs that differentiated *M. a. paratuberculosis* types were devised and shown to accurately screen a panel ($n=78$) of *M. a. paratuberculosis* strains. Analysis of insertion/deletion region INDEL12 showed deletion events causing a reduction in the complement of mycobacterial cell entry genes in *M. a.*

paratuberculosis type II strains and significantly altering the coding of a major immunologic protein (MPT64) associated with persistence and granuloma formation. Analysis of MAPAC data also identified signal variations in several genomic regions, termed variable genomic islands (vGIs), suggestive of transient duplication/deletion events. vGIs contained significantly low GC% and were immediately flanked by insertion sequences, integrases, or short inverted repeat sequences. Quantitative PCR demonstrated that variation in vGI signals could be associated with colony growth rate and morphology.

In our second study, we used the microarray technique to understand pathogenic mechanisms used by the control *M. a. paratuberculosis* strain by transcriptomic analysis during cell entry in different hosts, particularly focusing on *mce* gene operons.

Mammalian cell entry (*mce*) genes are widely conserved amongst pathogenic mycobacteria and are associated with virulence and pathogenesis. However, *M. a. paratuberculosis* *mce* genes have not been widely studied and the regulatory mechanisms of these operons are unknown. The main objective of this study was to investigate pathogenic mechanisms used by *M. a. paratuberculosis* during cell entry in different hosts, particularly focusing on *mce* gene operons.

GHC using the MAPAC array, characterized a *M. a. paratuberculosis* variant strain with a 16 Kb deletion that included the *mce7_1* operon, *mce* associated genes, members of the PE/PPE families and a transcriptional regulator. The deletion was present in an epidemiologically linked group of *M. a. paratuberculosis* isolates associated with paucibacillary infection in goats. PCR screening of a panel of 99 *M. a. paratuberculosis* isolates from 20 goat and cattle herds identified 53 MAP isolates from four epidemiologically related goat herds containing the 16 Kb deleted region. Post-mortem examination and histopathology of a reduce number of goats infected with this strain demonstrated a characteristic moderate to severe diffuse infiltration with lymphocytes and macrophages (with Ziehl-Neelsen positive bacilli in the cytoplasm) associated with a paucibacillary presentation of the disease.

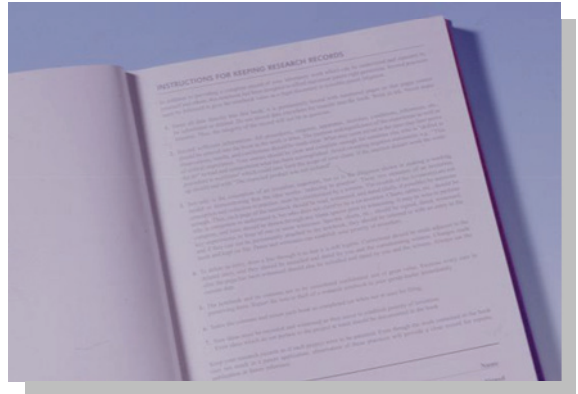
Comparative *in vitro* invasion studies using a variety of host cell lines (THP-1, CACO-2, BOMAC and MOCL-4) demonstrated significant differences in intracellular viability between a control *M. a. paratuberculosis* and variant *M. a. paratuberculosis* strains with the deletion. In addition, microarray data analysis of differential transcriptomic profiles of a control *M. a. paratuberculosis* type II strain induced during cellular entry into THP-1 and MOCL-4 cell lines demonstrated significant differences in expression of several PE/PPE genes and *mce* operons, including up- regulation of the *mce7_1* operon and adjacent genes

within the 16 Kb deleted region. This data suggests a possible role for this 16 Kb region in influencing mechanisms of *M. a. paratuberculosis* intracellular pathogenesis.

Capítulo VI / Chapter VI

Discusión

Discussion



“Lo importante en ciencia no es el encontrar nuevos hechos o revelaciones sino descubrir nuevas formas de pensar acerca de ellos”

“The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them”

William Lawrence Bragg, Premio Nobel de Física en 1915

El agente etiológico de la enfermedad de Johne o paratuberculosis, *M. a. paratuberculosis* ha sido aislado de multitud de huéspedes y localizaciones ambientales, aunque los hospedadores principales son los rumiantes domésticos (Biet y col. 2005). El impacto económico derivado de esta enfermedad en animales de abasto es elevado, debido tanto a pérdidas económicas directas (disminución de los rendimientos de la producción láctea) así como indirectas (influencia en la comercialización, interferencia diagnóstica con otras enfermedades, etc.) (Harris y Barletta, 2001).

Los métodos de diagnóstico empleados en la actualidad son muy variados en cuanto a sensibilidad y especificidad, ambas características directamente relacionadas con la fase clínica en la que se encuentra el animal infectado. Hasta el momento, el método de elección empleado en el diagnóstico de paratuberculosis es el cultivo microbiológico. Sin embargo, *M. a. paratuberculosis* se caracteriza por ser un microorganismo de crecimiento lento (habiéndose descrito períodos de incubación superiores a ocho meses, en especial las cepas del tipo I y III), siendo incluso en ocasiones no cultivable (Gunnarsson y Fodstad, 1979; Whittington y col. 2001).

M. a. paratuberculosis se encuadra filogenéticamente en el complejo *Mycobacterium avium* (MAC). Dentro de MAC, además de *M. a. paratuberculosis* se incluyen otras micobacterias patógenas, no sólo para los animales sino para el hombre, las cuales pueden ocasionar cuadros clínicos en pacientes tanto inmunodeprimidos como inmunocompetentes, como es el caso de *M. a. hominisuis* o *Mycobacterium intracellulare*.

Estos miembros de MAC son distinguibles únicamente mediante técnicas genéticas costosas y laboriosas, que en ocasiones constituyen un impedimento en el diagnóstico del agente causal responsable de un cuadro clínico determinado en un paciente. Consecuentemente, una de las técnicas de caracterización molecular rápidas desarrolladas y optimizadas durante el transcurso de esta tesis fue además aplicada en el genotipado de estos miembros del complejo.

Por lo tanto, en la presente tesis doctoral se resume el compendio de técnicas moleculares rápidas que fueron desarrolladas, dentro del marco de investigación del proyecto europeo ParaTBTools, con el fin de poder llevar a cabo la caracterización molecular de aquellas cepas de *M. a. paratuberculosis* fenotípicamente distinguibles por la presencia de un crecimiento lento, a la vez que limitado (hecho que dificultaba la aplicación de las herramientas moleculares disponibles hasta el comienzo de la tesis), así como de otros miembros de MAC.

Al final del capítulo I, se describe el proyecto europeo ParaTBtools, el cual constituye una iniciativa conjunta de un grupo de instituciones para llevar a cabo la estandarización, armonización y optimización de las diferentes técnicas de laboratorio empleadas para el diagnóstico de la paratuberculosis en animales de abasto. A su vez, dentro de este proyecto se fijaron otros objetivos dentro de los cuales se encuentra el de la descripción y el análisis de los mecanismos de interacción hospedador-patógeno durante el transcurso de la enfermedad (recogido en el capítulo V de la presente tesis).

Dentro de este contexto, la caracterización molecular de los aislados de *M. a. paratuberculosis* tiene el propósito principal de determinar la posible relación entre los aislados de diferentes especies animales y localizaciones geográficas, así como la descripción de la existencia de reservorios de la enfermedad tanto en animales salvajes como domésticos.

Las técnicas moleculares más empleadas en la caracterización de los aislados de *M. a. paratuberculosis* eran el PFGE y IS900-RFLP (Pavlik y col. 1999; Stevenson y col. 2002). Estas dos técnicas dividían los aislados de *M. a. paratuberculosis* en tres grupos o tipos (I u ovino, II o bovino y III o intermedio). Sin embargo, ambas técnicas moleculares sólo se pueden aplicar en cepas de *M. a. paratuberculosis* que presentan una tasa de crecimiento mayor, capaces de producir suficiente ADN genómico (alta calidad y cantidad), requisitos que en ocasiones no son factibles para los aislados de crecimiento más lento (tipos I y III especialmente).

Siguiendo con esta línea, y tal y como se recoge en el capítulo II de la memoria, comenzamos por analizar las secuencias de posibles genes o secuencias diana descritos hasta ese momento como polimórficos en *M. a. paratuberculosis* o en otros miembros del género *Mycobacterium*. Así, entre los tres tipos de cepas de *M. a. paratuberculosis* (I, II y III), la existencia de polimorfismos de nucleótido único (SNP) en las dianas analizadas (*gyrA*, *gyrB*, *inh-A* e IS900), y específicos para cada uno de los tipos, podría ser el reflejo de la evolución divergente de las mismas o representación de la presión selectiva ocasionada por el tratamiento antibiótico. Además de la información aportada en lo que respecta a la filogenia evolutiva de la subespecie, la descripción de SNPs específicos en las cepas del tipo III en los genes *gyrB* e *inh-A*, con secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *Hpy188III* y *SinI*, dieron lugar a la descripción de nuevos métodos para la identificación de las cepas de crecimiento más lento (I y III), empleando para ello cantidades reducidas de ADN genómico. De esta manera, mediante esta técnica de PCR y análisis de restricción enzimática (PCR-REA) podría ser caracterizado ADN genómico de *M. a. paratuberculosis* procedente de muestras biológicas como tejidos, sangre, leche, etc.; aislados no cultivables o de crecimiento muy lento.

La presencia de diferencias respecto a inserciones/deleciones de complemento genético fueron descritas inicialmente para algunos de los miembros de MAC y definidas como fragmentos polimórficos largos (LSPs) (Semret y col. 2005; Semret y col. 2006). Diversos estudios han atribuido a la presencia/ausencia de estos LSPs las diferencias fenotípicas y de patogenia características de cada uno de los tipos de cepa de *M. a. paratuberculosis* (Paustian y col. 2008).

Así mismo analizamos la distribución de todos los LSPs descritos hasta la fecha en la literatura como específicos de las cepas ovinas o tipos I/III, LSP^A4-II, LSP^A18 y LSP^A20, en un panel de cepas de *M. a. paratuberculosis* representantes de los tipos I, II y III (Álvarez y col. 2008). Este trabajo reveló el mismo perfil de distribución de estos LSPs en las cepas del tipo I y III, sugiriendo la presencia de un proceso evolutivo paralelo en ambos tipos.

El hecho de haber observado la presencia de un complemento genómico idéntico en ambos tipos de cepas respecto a los anteriores LSPs, nos animó a continuar el estudio anterior realizando un análisis de hibridación genómica comparada con el microarray MAPAC en un panel de aislados de *M. a. paratuberculosis* representantes del tipo I, II y III (capítulo V). Este microarray, constituido por marcos de lectura abiertos (ORF) de los genomas de *M. a. hominis* y *M. a. paratuberculosis* K-10 (cepa de referencia, tipo II),

confirmó los LSPs descritos previamente en otros estudios de HGC realizados con microarray (Semret y col. 2004; Semret y col. 2005; Semret y col. 2006; Marsh y Whittington, 2006; Paustian y col. 2008), además de facilitar la descripción de diferencias genéticas nóveles y específicas para cada uno de los tres tipos de cepas.

En este estudio se vio que todas las cepas de *M. a. paratuberculosis* del tipo I y III presentaban 62 ORFs homólogos al genoma de *M. a. hominissuis* 104 pero divergentes con respecto al genoma de *M. a. paratuberculosis* K-10. Por otra parte, al comparar las cepas de tipo I y III con la cepa *M. a. paratuberculosis* K-10, las cepas de tipo I analizadas presentaron deleciones en dos ORFs y las cepas de tipo III en siete ORFs (de los cuales seis eran loci consecutivos). Los datos obtenidos mediante microarray se validaron mediante el diseño y posterior optimización de PCRs dirigidas a fragmentos específicos de las cepas de tipo I y III. Estas PCRs, constituyen nuevas herramientas de diagnóstico molecular que al igual que las técnicas anteriormente descritas, son de fácil reproducción a nivel inter-laboratorial y además permiten la caracterización de aislados de *M. a. paratuberculosis* a partir de cantidades de ADN genómico reducidas.

En lo que respecta a los datos de filogenia de *M. a. paratuberculosis* publicados se extrae que los tres tipos de cepas han sufrido una evolución divergente a partir de un ancestro común (Turenne y col. 2008), de este estudio se infiere que las cepas del tipo II presentan un mayor número de deleciones respecto a ese ancestro en comparación con las cepas del tipo I y III. Este proceso parece ser el origen causal de una mayor distribución geográfica y mejor adaptación de hospedador de las cepas tipo II en comparación con la de los otros dos tipos. Sin embargo, aunque las cepas del tipo I y III han evolucionado menos con respecto al ancestro común, la presencia de las denominadas islas genómicas variables (vGI), las reorganizaciones genómicas y las deleciones génicas en los genomas de éstas han favorecido también una amplia diversificación de las mismas.

La clasificación actual de *M. a. paratuberculosis* en tres grupos se ha realizado con base en los resultados obtenidos de las diferentes publicaciones, aunque en muchos estudios únicamente se distinguen dos tipos o grupos (ovino y bovino), sin embargo la clarificación de la taxonomía de los diferentes linajes no se producirá hasta que tengamos los datos de secuenciación de los genomas completos de las cepas de *M. a. paratuberculosis* de los tipos I y III.

Por otro lado, la necesidad de trazar epidemiológicamente los distintos brotes de la enfermedad de Johne y determinar los reservorios salvajes o domésticos de la misma llevaron

al desarrollo de nuevas metodologías dirigidas a la subtipificación molecular de los aislados de *M. a. paratuberculosis*. Previamente, el análisis mediante MIRU-VNTR se había aplicado en la subtipificación molecular de *M. a. paratuberculosis* y otros aislados de MAC de Argentina, Alemania, Francia y Reino Unido (Bull y col. 2003; Overduin y col. 2004; Romano y col. 2005; Thibault y col. 2007; Möbius y col. 2008; Möbius y col. 2009). En el capítulo III se describe el análisis y evaluación de seis loci MIRU-VNTR en un panel de aislados de *M. a. paratuberculosis* españoles, en el que se incluyeron cepas de los tipos II y III. Hasta la fecha de inicio de nuestro estudio no se había determinado la variabilidad genética dentro de las cepas del tipo III mediante esta técnica, sin embargo, durante el transcurso de éste se caracterizaron cepas tipo III de Alemania, aunque tan sólo dos aislados (Möbius y col. 2009). Como resultado de la aplicación de esta técnica de MIRU-VNTR se obtuvo un índice de discriminación (HGDI) de 0,84, superior al obtenido hasta la fecha en otros aislados españoles de *M. a. paratuberculosis* mediante el empleo de otras técnicas moleculares como PFGE (de Juan y col. 2005; Sevilla y col. 2007). A su vez, como aportación novedosa de este estudio, al igual que se había publicado previamente en *M. tuberculosis* (Supply y col. 2006), destaca la descripción de una tabla de correspondencias alélicas en el que se estandarizaron el número de unidades de repetición con los tamaños de fragmentos amplificados mediante PCR.

En lo referente al análisis individualizado de cada uno de los loci, cabe destacar que las cepas del tipo III españolas presentaron un menor número de unidades de repetición en dos de ellos (MIRU-3 y VNTR-259), ambos localizados entre dos genes constituyentes de un único sistema regulador.

Previamente, el análisis de las diferencias en las unidades de repetición del MIRU localizado entre los genes *senX3* y *regX3* ya resaltó la presencia de una reducción de 53 pb en las cepas vacunales de *M. bovis* BCG (Magdalena y col. 1998) y *M. a. paratuberculosis* 316F (Bull y col. 2003); hecho además observado en todas las cepas del tipo III de *M. a. paratuberculosis* incluidas en nuestro trabajo.

Asimismo, el locus novel VNTR-259, descrito en nuestro trabajo y también localizado entre un sistema regulador de dos componentes, presentó un menor número de copias de unidades de repetición en las cepas de *M. a. paratuberculosis* del tipo III (una copia) con respecto a las del tipo II (dos copias). Estos polimorfismos en el número de unidades de repetición observados en ambos loci, pueden estar a su vez relacionados con las variaciones fenotípicas y las diferencias en los mecanismos de virulencia descritos para cada uno de los

tipos de *M. a. paratuberculosis* (Verna y col. 2007) puesto que se ha descrito que estos elementos intergénicos podrían ser los responsables a su vez de la variación génica (Lindstedt y col. 2005).

Este trabajo de estandarización y armonización en lo referente a la interpretación de los resultados del número de unidades de repetición permitió el empleo de esta herramienta molecular de subtipificación para el estudio de la epidemiología de otros miembros de MAC aislados en España de aves rapaces en libertad (capítulo III). Al igual que en el caso de las cepas de *M. a. paratuberculosis* del tipo III, el estudio de la variabilidad genética intraespecie en otros miembros de MAC ha sido reducido en otras localizaciones geográficas e inexistente en España. Para ello, tras la aplicación de un conjunto de MIRU-VNTR loci se analizó la diversidad genética en aislados clínicos de *M. a. avium*. Entre los loci empleados, el MIRU-3 destacó por ser altamente polimórfico entre los distintos aislados de *M. a. avium* incluidos.

La elevada cantidad de información genética que se obtiene tras la aplicación de estas técnicas en ocasiones es innecesaria para algunos laboratorios destinados al diagnóstico clínico. Éstos necesitan únicamente técnicas moleculares rápidas capaces de amplificar genes diana específicos de *M. a. paratuberculosis*. Con este propósito, en la actualidad, se han diseñado herramientas moleculares de fácil ejecución y puesta a punto que no requieren separaciones adicionales en geles de agarosa como la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Teniendo en cuenta estas necesidades, en el capítulo IV se describe el desarrollo y la aplicación de una técnica molecular rápida, basada en los principios de amplificación por qPCR (análisis de curvas de disociación de alta resolución, HRM), hasta la fecha sólo empleada en el genotipado de cepas de *M. tuberculosis* (Pietzka y col. 2009). Utilizando como diana el gen MAP1506, que está descrito como polimórfico con SNPs específicos para cada uno de los tipos de *M. a. paratuberculosis* (Griffiths y col. 2008), se analizaron las diferencias en las curvas de disociación producidas tras la liberación del agente colorante intercalante EvaGreen. Como resultado, tras un protocolo rápido de amplificación (1 hora y 30 minutos), se observaron diferencias en las curvas de disociación, únicas y específicas para cada uno de los tres tipos de cepas de *M. a. paratuberculosis* (I, II y III).

Esta técnica presenta varias aplicaciones posibles como la del análisis de los loci de repeticiones de secuencia corta (SSR), empleados en la subtipificación molecular de aislados de *M. a. paratuberculosis* y que en la actualidad se amplifican por PCR y que posteriormente se secuencian e interpretan de manera convencional (Motiwala y col. 2004; Sevilla y col. 2008;

Thibault y col. 2008). Dado que estos loci polimórficos están constituidos por residuos ricos en G y C, la aplicación de esta técnica para la amplificación de estos SSR sería plausible, fácilmente reproducible y estandarizable.

Sin embargo, debemos destacar que en esta técnica todos los ADN a analizar han de haber sido extraídos empleando la misma metodología, ya que en caso contrario, las propiedades termodinámicas del ADN y consecuentemente las curvas de disociación pueden verse alteradas (por ejemplo, debido al empleo de diferentes tampones de elución con diferente contenido en sales, etc.).

Siguiendo con esta línea de investigación, aplicamos esta técnica de HRM en aislados de *M. a. paratuberculosis* y otros miembros de MAC. Los miembros de MAC han sido aislados tanto de muestras ambientales como de personas. La ausencia de técnicas moleculares rápidas capaces de discriminar entre éstos nos llevó a trabajar en el desarrollo y posterior aplicación de HRM en éstos (capítulo IV). En este trabajo, partimos de las diferencias nucleotídicas descritas en la secuencia del gen MAP1505 (MACPPE24) entre algunos de los miembros de MAC (Mackenzie y col. 2009), con especial interés en las existentes en los patógenos comúnmente identificados en el hombre, *M. hominissuis* y *M. intracellulare*.

La descripción de la técnica de HRM podría ser útil para su empleo en la identificación y genotipado de los agentes causales de procesos infecciosos en personas más comúnmente producidas por miembros de MAC. Además, las técnicas empleadas en la actualidad son costosas y laboriosas, lo que implica que muchos de los laboratorios de diagnóstico clínico únicamente determinen la presencia de un miembro de MAC sin llegar a la completa identificación del agente causal. No obstante, la estandarización completa de la técnica debe incluir la realización de ensayos que comprendan más aislados clínicos y las otras especies miembros de MAC.

Además, durante el transcurso de este trabajo la aplicación de las técnicas moleculares descritas en una colección de aislados de *M. a. paratuberculosis* mayor derivó en la primera descripción de cepas del tipo II con deleciones en genes *mce* y miembros de la familia PE/PPE, relacionados con la virulencia de *M. a. paratuberculosis*, así como de otras micobacterias (capítulo V).

Estos aislados de *M. a. paratuberculosis* del tipo II, fueron obtenidos inicialmente de cabras de la raza de Guadarrama de la zona centro de España en un estado clínico de la enfermedad de Johne. La necropsia de las mismas presentó hallazgos macroscópicos

compatibles con paratuberculosis y la posterior histología mostró una lesión de tipo paucibacilar (de Juan y col. 2006). Los aislados procedentes de este caso fueron sometidos a un análisis por microarray (MAPAC), que reveló la ausencia de un complemento genómico de 16,3 Kb. Esta delección, constituida por 19 ORFs (MAP0108-MAP0126) fue corroborada tras el diseño y optimización de una PCR dirigida a las regiones flanqueantes de ésta. Posteriormente, esta PCR fue empleada para el análisis de un panel de aislados de *M. a. paratuberculosis* más extenso (n=99), aislados entre los cuales se encontraron 53 con esta misma delección.

De especial relevancia debe considerarse la ausencia de siete ORFs que codifican genes *mce* y también proteínas asociadas (MAP0108-MAP0114). Aún hoy, el mecanismo específico de funcionamiento de estos genes *mce* no ha sido completamente descrito, sin embargo se ha publicado que la pérdida de estas regiones *mce* en otras micobacterias patógenas puede llegar a afectar profundamente a la virulencia de las mismas ocasionando un retraso en el comienzo de la infección debido a una entrada celular ralentizada (Gioffre y col. 2005), así como la presencia de cambios importantes en los mecanismos de patogenia, como son la formación de granulomas (Shimono y col. 2003). Otros estudios han propuesto además, que las diferencias en el complemento *mce* en otros miembros del complejo MAC pueden constituir factores importantes en cuanto a las variaciones en los mecanismos de patogenia patógeno-hospedador (Cangelosi y col. 2006). Además de estos genes *mce* también estaban delecionados tres miembros de la familia PE/PPE, cuya estrecha relación con la evasión del sistema inmune ha sido descrita previamente (Newton y col. 2009) y los cuales se han visto directamente vinculados en la variación antigénica e interacciones celulares en algunos miembros del género *Mycobacterium* (Griffiths y col. 2008).

Para estudiar el papel de estos genes *mce* y PE/PPE durante los procesos de infección, se realizaron experimentos de invasión *in vitro* en dos líneas celulares (MOCL-4 y THP-1) con la cepa control de *M. a. paratuberculosis* (cepa de referencia K-10). Posteriormente se realizó un análisis transcriptómico de la expresión diferencial de los genes de *M. a. paratuberculosis*. La súper-expresión observada para algunos de los genes incluidos dentro de la delección de 16 Kb en la cepa de *M. a. paratuberculosis* control refleja la importancia de algunos de estos genes durante el proceso de infección. Sin embargo, la infra-regulación de otros genes *mce* y PE/PPE pone de manifiesto la existencia de una compleja red de regulación génica a la que estas familias de genes están sometidas. La ausencia de un complemento genómico que incluya alguno de estos genes en una cepa virulenta de *M. a. paratuberculosis* en

cabras estaría relacionada con el empleo de mecanismos de patogenia nóveles no descritos hasta el momento en *M. a. paratuberculosis*. Con el objetivo de estudiar la viabilidad de esta cepa de *M. a. paratuberculosis* en líneas celulares obtenidas de otros hospedadores diferentes de cabras (bovino, ovino y humano) se procedió a la medición del gen pre-ARNr 16S mediante qPCR. Los resultados demostraron la capacidad invasiva de esta cepa, sin embargo, su viabilidad fue muy reducida en el caso de macrófagos activados de origen humano.

M. a. paratuberculosis, the etiological agent of Johne's disease or paratuberculosis has been obtained from multiple hosts and environmental locations, mainly from domestic ruminants (Biet et al. 2005). The economic implications derived from this disease in livestock are due to direct factors (reduction in production output) and indirect (diagnostic interference with other diseases, etc.) (Harris and Barletta, 2001).

At present, diagnostic methods used to detect the disease vary in terms of sensitivity and specificity, which are directly related to the clinical status of the infected animal. To date, the gold standard method in the diagnosis of paratuberculosis is microbiological culture. However, *M. a. paratuberculosis* is a slow-growing mycobacterium (incubation periods over eight months have been reported, especially in types I and III strains), that in some cases is non-cultivable (Gunnarsson and Fodstad, 1979; Whittington et al. 2001).

M. a. paratuberculosis is a part of the *Mycobacterium avium* complex (MAC). Within this group, exist pathogens of not only animals but also immunocompromised and immunocompetent humans, such as *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* or *Mycobacterium intracellulare*. These MAC members are only distinguishable by genetic methods that are expensive and time-consuming. This is often an obstacle encountered in diagnosing the etiological agent responsible for the characteristic clinical outcome in a particular patient. Consequently, a rapid molecular characterization technique, optimized during the course of this thesis was also applied for the genotyping of some members of this complex.

Therefore, in the current doctoral thesis we summarize a compendium of all the rapid molecular techniques developed, all framed within the European project ParaTBTools. These methods aimed to characterize those strains of *M. a. paratuberculosis* which were phenotypically distinguishable by a slow-growth rate (a fact that hampered the use of the molecular tools available at the beginning of this thesis), as well as other members of MAC.

At the end of chapter I, the European project ParaTBtools is described. This project constitutes a common initiative of a group of institutions in order to achieve the standardization, harmonization and optimization of the different techniques used in the laboratory to diagnose Johne's disease in livestock. In addition, this project included other objectives, such as the description and analysis of host-pathogen interactions along the course of the disease (summarized in chapter V of this thesis).

In this context, the molecular characterization of *M. a. paratuberculosis* isolates is addressed to determine the possible relationship between isolates from different animals and geographic locations and also the description of reservoirs of the disease in wild and domestic animals.

From the beginning of this work, the most widely used molecular characterization techniques were PFGE and RFLP-IS900 (Pavlik et al. 1999; Stevenson et al. 2002). These two techniques divided *M. a. paratuberculosis* isolates into three groups or types (I or ovine, II or bovine and III or intermediate). However, both methods were only capable of characterizing those *M. a. paratuberculosis* isolates that produced the prerequisite genomic DNA parameters (high quality and quantity), requirements that sometimes are often not feasible for the most slow-growing phenotypes (specially types I and III).

Continuing with this line of research, and compiled in chapter II of this summary is the analysis of possible target genes previously described as polymorphic in *M. a. paratuberculosis* or other members of the genus *Mycobacterium*. The presence of single nucleotide polymorphisms (SNP) in the analyzed targets (*gyrA*, *gyrB*, *inh-A* and IS900), specific for each *M. a. paratuberculosis* types (I, II and III), could be a reflection of their divergent evolution or may represent of the selective pressure due to antibiotic treatment.

Additionally, apart from the information regarding the phylogeny of the subspecies, the description of specific SNPs in type III strains in *gyrB* and *inh-A* genes, which were recognized sites for the restriction enzymes *Hpy*188III and *Sin*I, resulted in the description of new methods to identify the most slowing phenotypes (I and III) which required low genomic DNA templates. In this manner, with this PCR and enzymatic restriction analysis (PCR-REA) technique, *M. a. paratuberculosis* genomic DNA from biological samples such as tissues, blood, milk, etc.; non-cultivable isolates or those isolates with very slow-growing rate could be characterized.

The presence of insertion/deletion events in the genomic complement were initially described in some of the members of MAC as large fragment polymorphisms (LSPs) (Semret et al. 2005; Semret et al. 2006). Various publications have attributed the presence/absence of these LSPs to the different phenotypes and pathogenic features of each of the *M. a. paratuberculosis* types (Paustian et al. 2008). Accordingly, in an initial screening we analyzed the distribution of all LSPs specific for ovine strains or types I/III reported in the literature, LSP^A4-II, LSP^A18 and LSP^A20, in a collection of *M. a. paratuberculosis* strains representing types I, II and III (Álvarez et al. 2008). This investigation revealed the same distribution pattern of these LSPs in types I and III strains, suggesting the presence of a parallel evolution of these two types.

Despite having observed the presence of an identical genomic complement in both strain types, as a continuation of this preliminary study we performed a study of genomic hybridization comparison (GHC), using the MAPAC microarray (Bug@s, Saint Georges University, London, United Kingdom), including a panel of *M. a. paratuberculosis* isolates from types I, II and III (chapter V). This microarray includes open reading frames (ORF) from *M. a. hominissuis* 104 and *M. a. paratuberculosis* K-10 (reference strain, type II) genomes. This technique confirmed the LSPs previously described in other GHC studies (Semret et al. 2004; Semret et al. 2005; Semret et al. 2006; Marsh and Whittington, 2006; Paustian et al. 2008) and also helped to describe novel and specific genetic differences for each strain type.

In this research, we observed that every type I and III strain of *M. a. paratuberculosis* presented 62 ORFs, which were homologous to the *M. a. hominissuis* 104 genome but divergent to the *M. a. paratuberculosis* K-10 genome. Moreover, the comparison between strains of types I and III with *M. a. paratuberculosis* K-10 (type II), displayed a deletion of two ORFs in every type I strain included and seven ORFs in type III strains (whereas six were located in consecutive loci). Data obtained from the microarray was validated with the design

and subsequent optimization of PCRs aimed to these types I and III specific fragments. These PCRs comprise further tools for molecular diagnosis that, as well as the previously described ones, are easily reproducible between different laboratories and allow the characterization of all types of *M. a. paratuberculosis* isolates (even the most slow-growing phenotypes).

The three strain types of *M. a. paratuberculosis* have suffered a divergent evolution from a common ancestor (Turenne et al. 2008). From our study we could infer that the presence of a greater number of deletion events in type II strains in comparison to types I and III could be the origin of the major geographic distribution and the better adaptation of type II strains.

Still, although strain types I and III have evolved less from the common ancestor, the presence of variable genomic islands (vGI), genomic reorganizations and genetic deletions in their genomes have also favored their diversification.

The current classification of *M. a. paratuberculosis* into these three groups is based on the results obtained from the different publications; however, the majority of these studies distinguished only two types or clusters (ovine and bovine). The clarification of the taxonomy of the lineages will not be confirmed until we have the complete genome sequence data of strains of *M. a. paratuberculosis* types I and III.

Conversely, the need to establish epidemiological links between different outbreaks of Johne's disease and also to determine the reservoirs in wild or domestic animals led us to the development of new methodologies focused on the molecular subtyping of *M. a. paratuberculosis* isolates.

Previously, MIRU-VNTR analysis had been applied in the molecular subtyping of *M. a. paratuberculosis* and other MAC members from Argentina, Germany, France and the United Kingdom (Bull et al. 2003; Overduin et al. 2004; Romano et al. 2005; Thibault et al. 2007; Möbius et al. 2008; Möbius et al. 2009).

In chapter III, I describe the analysis of six MIRU-VNTR in a collection of Spanish *M. a. paratuberculosis* isolates of types II and III. Prior to the commencement of the study, the genetic variability within type III strains with this technique had not been established, although during the course of the study two type III isolates of German origin were characterized (Möbius et al. 2009).

The application of this MIRU-VNTR-based technique yielded an index of discrimination (HGDI) of 0.84, greater than that obtained from other Spanish *M. a.*

paratuberculosis isolates with other molecular techniques such as PFGE (de Juan y col. 2005; Sevilla et al. 2007). Besides this, as a novel contribution to this investigation, and as formerly published in *M. tuberculosis* (Supply et al. 2006) it is noticeable the description of an allele calling table with the allelic correspondences between number of repeat units and sizes of PCR fragments.

In relation to the individual analysis of each locus, it is remarkable that Spanish type III strains showed a lower number of repeat units at two of them (MIRU-3 and VNTR-259), both loci located between two-component regulatory systems.

Previously, the evaluation of the differences in the number of repeat units present at the MIRU located between genes *senX3* and *regX3* revealed the presence of a reduction of 53 bp in the vaccine strains *M. bovis* BCG (Magdalena et al. 1998) and *M. a. paratuberculosis* 316F (Bull et al. 2003), but also in every *M. a. paratuberculosis* type III strain included in our study.

Furthermore, the novel locus VNTR-259, described in this work, also located between a two-component regulatory system, showed a lower number of repeat units in *M. a. paratuberculosis* type III strains (one copy) compared to those of type II (two copies). The polymorphisms observed at the number of repeat units at both loci could be related to the phenotypic variations and the differences observed in the virulence mechanisms specific for each type of *M. a. paratuberculosis* (Verna et al. 2007). These findings could confirm former hypotheses wherein these intergenic elements were defined as possible sources of genetic variation (Lindstedt et al. 2005).

This previous study, which standardized and harmonized the interpretation of the number of repetitive units, provided us with the possibility to apply this molecular subtyping tool in the study of the epidemiology of other MAC members, acquired from birds of prey in Spain (chapter III). As in *M. a. paratuberculosis* type III strains, the description of the intraespecies genetic variability present in other MAC members was limited in other geographic locations and nonexistent in Spain.

Accordingly, we studied the genetic diversity present in 14 clinical isolates of *M. a. avium* with a combination of MIRU-VNTR loci. From these loci, MIRU-3 appeared to be highly polymorphic for *M. a. avium* isolates. These results are congruent with those obtained from *M. a. paratuberculosis* isolates and could help us to postulate that the polymorphisms at this particular locus could also be related to the various pathogenic mechanisms or the divergences in the progression of the disease in different hosts.

The enormous amount of genetic information obtained with these techniques maybe deemed unnecessary in clinical diagnostic laboratories. Lower resolution rapid molecular techniques capable of amplifying target genes, specific for *M. a. paratuberculosis* maybe more desirable in these settings.

Therefore, novel molecular tools which are easy to perform and optimize that do not require additional separation steps in agarose gels have been described such as real time quantitative PCR (qPCR). Considering these necessities, in chapter IV we describe the development and application of a rapid molecular technique (high resolution melt analysis, HRM), based on the principles of qPCR amplification, which had subsequently applied in the genotyping of *M. tuberculosis* (Pietzka et al. 2009). Using as a target gene MAP1506, described as polymorphic with specific SNPs for each *M. a. paratuberculosis* type (Griffiths et al. 2008), we analyzed the differences in the melting curves produced after the release of the intercalating dye, EvaGreen. As a result, after a fast amplification protocol (1h and 30 minutes) we observed differences in the melting curves, unique and specific for each *M. a. paratuberculosis* type (I, II and III).

This technique presents various potential applications such as the analysis of short sequence repeat loci (SSR), previously amplified by conventional PCR and then sequenced and interpreted. SSR based approaches have been widely used in the molecular subtyping of *M. a. paratuberculosis* (Motiwala et al. 2004; Sevilla et al. 2008; Thibault et al. 2008).

As these polymorphic loci are made up of sequences rich in G and C, the use of this technique for the amplification of SSR would be feasible and easy to reproduce and standardize.

However, we should highlight that every DNA submitted to this analysis must be previously extracted with the same methodology. If this is not the case, the thermodynamic properties of DNA and the subsequent melting curves may be altered (for instance, the use of various elution buffers with different salt concentrations, etc.).

Continuing with this line of research, we applied HRM in *M. a. paratuberculosis* isolates and also other MAC members. MAC members are present in environmental samples and human isolates. Therefore, the lack of rapid molecular techniques capable of discriminating between these members led us to the development and application of the HRM in them (chapter IV). For this purpose, we used the SNPs described in the MAP1505 gene (MACPPE24) for some of the MAC members (Mackenzie et al. 2009), with special

interest to those pathogens commonly identified in humans, *M. hominis* and *M. intracellulare*.

Additionally, the description of the HRM method could be useful for identifying and genotyping MAC members responsible for infectious processes in humans. The techniques that are currently in use are time-consuming and expensive, thus many clinical diagnostic laboratories only identify the presence of MAC members without further genotyping the specific agent. However, the complete standardization needs to include more assays with a higher number of clinical isolates and other MAC members.

During the course of this work the application of the described molecular techniques in a panel of *M. a. paratuberculosis* resulted in the first description of type II strains with deletions in *mce* genes and members of the PE/PPE families, associated with virulence in *M. a. paratuberculosis* and other mycobacteria (chapter V).

These *M. a. paratuberculosis* isolates of type II were initially obtained from goats with clinical Johne's disease. These goats belonged to a Spanish native breed and were located in central Spain. The necropsy revealed macroscopic lesions compatible with paratuberculosis and histological examination showed a paucibacillary form of Johne's disease (de Juan et al. 2006). These *M. a. paratuberculosis* isolates were submitted to microarray analysis (MAPAC), which revealed the absence of a genomic complement of 16.3 Kb. This deleted region, that involved 19 consecutive ORFs (MAP0108-MAP0126), was corroborated by a PCR approach directed to the flanking regions. Then, this PCR was applied in the analysis of an extensive collection of *M. a. paratuberculosis* isolates (n=99), which identified the deletion in 53 of these isolates.

Special attention should be paid to the deletion of seven ORFs which codify *mce* genes and also *mce*-associated proteins (MAP0108-MAP0114). The precise function of the *mce* genes has not been fully reported, however, it has been published that the loss of these *mce* regions in some other pathogenic mycobacteria could profoundly affect their virulence, due to a delayed cell entry (Gioffre et al. 2005). Also the lack of these genes could lead to important changes related to the mechanisms of pathogenesis, such as granuloma formation (Shimono et al. 2003). Other reports have also hypothesized that differences in the *mce* complement in other MAC members could imply important factors related to the host-pathogen interplay (Cangelosi et al. 2006). In addition to these *mce* genes, gene members of the PE/PPE families were also deleted. Some studies have conclude that these genes may be related to the evasion of the immune system (Newton et al. 2009) and directly involved in

antigenic variation as well as cellular interactions in some of the members of the genus *Mycobacterium* (Griffiths et al. 2008).

To study the role of these *mce* and PE/PPE genes during the infection process, we performed different *in vitro* invasion assays with two cell lines (MOCL-4 and THP-1) with the control strain of *M. a. paratuberculosis* (K-10). Then we studied the differential expression of *M. a. paratuberculosis* genes by transcriptomic analysis in these two cell lines. The up-regulation observed for some of the genes included within the deleted 16 Kb region in the reference strain of *M. a. paratuberculosis* reflect the importance of some of these genes during the infection process. However, the down-regulation of other *mce* and PE/PPE genes suggests the presence of a complex gene regulatory network for these gene families. The absence of a genomic complement that includes some of these genes in a virulent strain of *M. a. paratuberculosis* in goats could be related to novel pathogenic mechanisms not previously described in *M. a. paratuberculosis*.

To study the viability of this *M. a. paratuberculosis* strain in cell lines from hosts other than goats (bovine, ovine and human) we measured the pre-16SrRNA gene by qPCR. The results showed the invasion capacity of this strain; however, its viability was reduced in the case of human activated macrophages.

Conclusiones

Conclusions



“La investigación consiste en ver todo lo que el resto ha visto y pensar lo que nadie antes ha pensado”

“Research is to see what everybody else has seen and to think what nobody else has thought”

Albert Szent-Györgyi, Premio Nobel de Medicina en 1937

Primera

El análisis de la secuencia de los genes *gyrA* y *gyrB* diferencia las cepas de *M. a. paratuberculosis* de los tipos I, II y III. Además, uno de estos SNPs, específico de las cepas de *M. a. paratuberculosis* tipo III presenta una diana de reconocimiento para la enzima de restricción *Hpy188III*. La técnica de PCR-REA dirigida a esta mutación constituye a su vez una técnica rápida para la discriminación de los aislados de *M. a. paratuberculosis* de crecimiento más lento, los tipos I y III.

Segunda

El gen *inh-A* presenta un SNP que es característico y específico para las cepas de *M. a. paratuberculosis* del tipo III. Este SNP constituye una diana de reconocimiento para la enzima de restricción *SimI*. La restricción enzimática previa amplificación por PCR de este gen presenta otra técnica de diagnóstico rápido para la diferenciación de las cepas de *M. a. paratuberculosis* del tipo III.

Tercera

Los polimorfismos presentes en la secuencia de inserción *IS900*, son específicos y únicos para cada uno de los tipos de *M. a. paratuberculosis* I, II y III. Estos polimorfismos que son conservados y específicos para cada tipo se puede emplear como diana para la diferenciación de los distintos tipos de *M. a. paratuberculosis*.

Cuarta

Todos estos genes constituyen nuevos loci polimórficos capaces de distinguir entre los tres tipos de cepas. Estas dianas componen nuevas herramientas diagnósticas no descritas anteriormente que pueden emplearse en la descripción epidemiológica de los patrones de distribución de los distintos tipos de aislados de *M. a. paratuberculosis* que ocurren en las distintas localizaciones geográficas.

Quinta

Los SNPs encontrados en los genes *gyrA*, *gyrB*, *inh-A* y la secuencia de inserción *IS900*, específicos a su vez para cada tipo de cepa de *M. a. paratuberculosis* son el reflejo a pequeña escala de la existencia de diferencias genéticas mayores entre ellos. Diferencias genéticas evidenciadas con la presencia/ausencia de los fragmentos polimórficos largos específicos para cada uno de los tipos.

Sexta

El análisis de MIRU-VNTR loci presenta una gran utilidad para la subtipificación molecular de aislados españoles de *M. a. paratuberculosis* y *M. a. avium*. Además, los polimorfismos en cuanto al número de repeticiones en los loci MIRU-3 y VNTR-259, observados en las diferentes cepas de *M. a. paratuberculosis* y *M. a. avium*, podrían estar involucrados en los diferentes mecanismos de patogenia y virulencia descritos previamente en la literatura.

Séptima

La técnica molecular basada en el análisis de las curvas de disociación tras la amplificación del gen MAP1506 mediante PCR en tiempo real (HRM) constituye una herramienta novel y rápida para la tipificación molecular de los aislados de *M. a. paratuberculosis*. Además, esta técnica presenta multitud de aplicaciones potenciales dirigidas al entendimiento de la epidemiología de *M. a. paratuberculosis*.

Octava

La técnica de HRM es aplicable en el genotipado de otros miembros del complejo *Mycobacterium avium* (MAC) diferentes de *M. a. paratuberculosis*. La posibilidad del empleo de esta técnica tanto en la caracterización molecular de aislados miembros de MAC obtenidos de muestras ambientales como muestras de pacientes, señala la utilidad de ésta. Sin embargo, para demostrar la aplicabilidad de esta técnica en la detección de la variabilidad intraespecie presente en las cepas de *M. a. hominissuis* se necesitan analizar más aislados clínicos y ambientales así como otros miembros de MAC.

Novena

El microarray es una herramienta molecular que ha servido para identificar nuevos LSPs específicos para cada uno de los tipos de cepas de *M. a. paratuberculosis*, así como regiones genómicas variables (vGIs). Las PCRs dirigidas a estas regiones genómicas específicas estables y variables para cada uno de los tipos de *M. a. paratuberculosis* I, II y III descritas mediante esta técnica constituyen una herramienta molecular rápida de caracterización de los aislados de *M. a. paratuberculosis*.

Décima

La técnica de microarray aplicada a cepas de *M. a. paratuberculosis* ha derivado en el primer hallazgo de cepa de *M. a. paratuberculosis* mutante natural con deleciones en genes de virulencia, como los genes de entrada a células mamíferas (*mce*) y miembros de las familias PE/PPE (Prolina-Ácido glutámico y Prolina-Prolina-Ácido glutámico).

First

The analysis of the sequence of genes *gyrA* and *gyrB* differentiates strains of *M. a. paratuberculosis* types I, II and III. Moreover, one of these SNPs, which is *M. a. paratuberculosis* type-III specific, presents a recognition site for the restriction enzyme *Hpy*188III. The PCR-REA technique aimed to target this mutation constitutes a rapid molecular tool for the differentiation of *M. a. paratuberculosis* isolates types I and III.

Second

Inh-A gene presents a SNP that is characteristic and specific for *M. a. paratuberculosis* type III strains. This SNP constitutes a recognition site for the restriction enzyme *SmI*. PCR amplification followed by enzymatic restriction of this gene accounts for another fast diagnostic tool for the differentiation of *M. a. paratuberculosis* type III strains.

Third

Polymorphisms present in the insertion sequence *IS900*, are specific and exclusive for each *M. a. paratuberculosis* type I, II and III. These polymorphisms, conserved and specific for each type, also act as a target for the differentiation of *M. a. paratuberculosis* types.

Forth

All these genes constitute novel polymorphic loci, capable to divide the three types of strains. These targets comprise new diagnostic tools not previously described that could be applied for the description of the distribution patterns of the *M. a. paratuberculosis* types that occur in the different geographic locations.

Fifth

The SNPs found in the *gyrA*, *gyrB*, *inh-A* and insertion sequence IS900, specific for each *M. a. paratuberculosis* type, could be the reflection in a small scale of the presence of major genomic differences between them. Further genetic differences were revealed by the presence/absence of large sequence polymorphisms specific for each type.

Sixth

The analysis of MIRU-VNTR loci presents a useful tool for the molecular subtyping of Spanish *M. a. paratuberculosis* and *M. a. avium* isolates. In addition, polymorphisms at the number of repeats at MIRU-3 and VNTR-259 loci, observed in the different strains of *M. a. paratuberculosis* and *M. a. avium* could have a role in the different pathogenic and virulence mechanisms that have been previously reported.

Seventh

The molecular technique based on the analysis of dissociation curves after real time amplification of MAP1506 gene (HRM) constitutes a novel and rapid tool for the molecular typing of *M. a. paratuberculosis* isolates. In addition, this technique presents several potential applications aimed to the understanding of the epidemiology of *M. a. paratuberculosis*.

Eighth

HRM technique is also applicable for the genotyping of other members of the *Mycobacterium avium* complex (MAC) different from *M. a. paratuberculosis*. The possible use of this technique for the molecular characterization of MAC isolates obtained from the environment or patients highlights its usefulness. To demonstrate its applicability in the detection of the intraespecies variability present in *M. a. hominissuis* isolates it would be necessary to analyze more clinical and environmental isolates as well as other MAC members.

Ninth

Novel LSPs, specific for each *M. a. paratuberculosis* type, and variable genomic islands (vGIs) have been identified by microarray analysis. PCRs targeting these specific stable and variable genomic regions for each type of *M. a. paratuberculosis* comprise rapid tools for the characterization of *M. a. paratuberculosis* isolates.

Tenth

The application of microarray in *M. a. paratuberculosis* strains obtained from Spanish goats have derived in the first description of a natural mutant strain of *M. a. paratuberculosis* with deletions in virulence genes such as mammalian cell entry genes (*mce*) and members of the PE/PPE families (Proline-Glutamic acid and Proline-Proline- Glutamic acid).

Resumen Summary



“Ciencia es sentido común en su máxima exposición”

“Science is simply common sense at its best”

Thomas Huxley, biólogo británico defensor de la teoría de la evolución de Charles Darwin

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enfermedad crónica granulomatosa que afecta principalmente al aparato digestivo de rumiantes domésticos, aunque la infección puede presentarse además en otras especies. El agente etiológico está incluido dentro del complejo *Mycobacterium avium* y se denomina *M. a. paratuberculosis*.

El objetivo del trabajo presentado en esta tesis se basa en el desarrollo y aplicación de nuevas herramientas de caracterización molecular rápidas aplicadas a *M. a. paratuberculosis*; focalizadas en la descripción y el empleo de estas nuevas metodologías para caracterizar los aislados de crecimiento más lento (tipos I y III). Todos estos estudios se enmarcaron dentro de dos proyectos, AGL2005-07792 (Ministerio de Ciencia e Innovación de España) y ParaTBTools FP6-2004-FOOD-3B-023106 (Unión Europea).

Mediante las técnicas moleculares tradicionales, actualmente empleadas, como PFGE e IS900-RFLP las cepas de *M. a. paratuberculosis* se dividen en tres tipos; tipo I (también denominado “ovino”), II (“bovino”) y III (“intermedio”). Sin embargo, cabe destacar que la caracterización molecular de algunos aislados y en especial los de crecimiento más lento (tipos I y III) mediante estas técnicas no puede ser realizada debido a los requerimientos de ADN necesarios para llevarlas a cabo (tanto en calidad como en cantidad). Además, estas técnicas destacan por su complejidad y por lo tanto son difíciles de aplicar de manera rutinaria en la caracterización molecular de *M. a. paratuberculosis*.

La necesidad del desarrollo de nuevas técnicas moleculares rápidas, menos laboriosas y costosas capaces de discriminar entre los tres tipos de cepas de *M. a. paratuberculosis* nos dirigió a esta línea de trabajo. Por este motivo comenzamos con el diseño de técnicas de PCRs para amplificar genes de expresión constitutiva (*house-keeping genes*) que posteriormente se secuenciaron para hallar diferencias específicas únicas para cada uno de los tres grupos de cepas. De éstos, los genes *gyrA* y *gyrB*, topoisomerasas implicadas en la regulación de la estructura helicoidal del ADN, presentaron SNPs específicos de cada tipo (I, II y III). Al mismo tiempo, uno de los SNPs del gen *gyrB* en las cepas del tipo III presentaba una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Hpy188III*. La restricción enzimática de las cepas de tipo III (genéticamente y fenotípicamente hasta la fecha únicamente diferenciables de las del tipo I mediante PFGE e IS900-RFLP) eran distinguibles respecto a las del tipo I y II.

Siguiendo con esta línea, el gen *inh-A*, cuyo producto de expresión es la enzima proteína reductasa transportadora de enoil-acil, involucrada en la elongación de ácidos grasos a ácidos micólicos también presentó SNPs específicos para cada uno de los tres tipos de cepas de *M. a. paratuberculosis*. Al igual que en el caso del gen *gyrB*, uno de los SNPs presentes en la secuencia del gen *inh-A* de las cepas del tipo III constituía una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *SimI*, con perfiles de restricción diferentes en las cepas del tipo III con respecto a las del tipo I.

Más adelante, desarrollamos otra técnica basada en PCR y secuenciación de una de las regiones diana más empleadas en el diagnóstico y la identificación de *M. a. paratuberculosis*, la secuencia de inserción IS900. El análisis de las diferentes secuencias obtenidas de la IS900 también reveló SNP específicos para cada uno de los tipos de *M. a. paratuberculosis* (I, II y III). Estos hallazgos constituyen una herramienta más para la identificación de los tres tipos de cepas de *M. a. paratuberculosis* a partir de tan sólo una pequeña cantidad de ADN, como el obtenido a partir de muestras biológicas (sangre, tejidos, etc.).

Sin embargo, a pesar de la clara división en tres tipos de las cepas de *M. a. paratuberculosis* obtenida mediante diferentes técnicas moleculares, la dificultad de aislamiento de los fenotipos de crecimiento más lento y la limitada distribución geográfica de algunos de los tipos (especialmente de las cepas tipo III o intermedias) hacía que hasta la fecha muchos estudios únicamente se refirieran a las cepas de *M. a. paratuberculosis* como tipos “bovino” y “ovino”, obviando la existencia de un tipo “intermedio”. Por todo esto, en colaboración con

la Universidad de Saint Georges (Londres, Reino Unido) realizamos una hibridación genómica comparada empleando la técnica de microarray en una colección de aislados de origen español y representantes de los tres tipos de *M. a. paratuberculosis* (I, II y III). Este trabajo puso de manifiesto las diferencias genéticas entre los tres tipos de cepas, observándose en todas las cepas de *M. a. paratuberculosis* del tipo I y III 62 ORFs homólogos al genoma de *M. a. hominissuis* 104 pero divergentes con respecto al genoma de *M. a. paratuberculosis* K-10. Además, al comparar las cepas tipo I y III con la cepa *M. a. paratuberculosis* K-10, las cepas tipo I analizadas presentaron deleciones en dos ORFs y las cepas tipo III en siete ORFs (de los cuales seis eran loci consecutivos). Empleando los datos anteriores se pusieron a punto técnicas de PCR dirigidas a fragmentos del genoma específicos para los tipos I y III, constituyendo nuevas herramientas para la identificación de éstos. No obstante, la técnica de microarray, técnica de la era post-genómica requiere personal cualificado para su realización, es un procedimiento costoso y sólo se puede llevar a cabo en las instalaciones adecuadas.

Debido a este hecho, y dada la gran cantidad de laboratorios que emplean la tecnología de PCR en tiempo real, pusimos a punto en colaboración con la Universidad de Calgary (Canadá) una técnica basada en los principios de tiempo real y de las diferencias en las curvas de disociación para caracterizar en tan sólo 1 hora y 30 minutos los aislados de *M. a. paratuberculosis*. Como complemento a este trabajo también empleamos los principios de esta técnica no sólo para diferenciar los subtipos de *M. a. paratuberculosis*, sino otros miembros de MAC con importancia tanto ambiental como clínica en el caso de pacientes inmunodeprimidos.

La necesidad de trazar los diferentes brotes de paratuberculosis que actualmente aparecen en las diferentes regiones geográficas, hacía imprescindible el desarrollo de una técnica capaz de subtipificar dentro las cepas de un mismo tipo. Por este motivo, y como complemento a los trabajos anteriores realizamos un análisis detallado de diferentes loci MIRU-VNTR en una selección de cepas. Como resultado de este trabajo describimos un nuevo locus (VNTR-259) y propusimos la estandarización del número de copias respecto a la interpretación de los resultados a partir de un gel de agarosa, al igual que se había hecho con anterioridad en otros miembros del género *Mycobacterium*. La combinación de loci empleada en el estudio (MIRU-2, MIRU-3, VNTR-25, VNTR-32 y VNTR-259) dio lugar a un valor de índice de discriminación HGDI de 0,84, un índice elevado e indicativo de la utilidad de esta técnica en lo que respecta a la trazabilidad epidemiológica de los brotes de la enfermedad.

Además, dado que esta técnica de MIRU-VNTR no había sido empleada hasta la fecha en España para la subtipificación de otros miembros del complejo MAC, la aplicamos a su vez a cepas de *M. a. avium* aisladas de aves rapaces en libertad.

Finalmente, la puesta a punto de todas estas metodologías derivó en la identificación y caracterización molecular de una variedad de cepas del tipo II de *M. a. paratuberculosis* obtenidas de cabras de la raza Guadarrama no antes descritas. Estas cepas presentaban una delección de 16 Kb en operones directamente relacionados con la virulencia de este microorganismo (entre ellos uno de los operones de entrada a células mamíferas, *mce*), por lo que representan la primera cepa mutante natural *mce* de *M. a. paratuberculosis*. La importancia de esta delección en la que se comprendían diferentes genes de virulencia (genes *mce* y otros genes de la familia PE, Prolina-Ácido Glutámico y PPE, Prolina- Prolina-Ácido glutámico) se determinó mediante ensayos de supervivencia previa infección *in vitro* en cuatro líneas celulares (MOCL-4, BOMAC, THP-1 y CACO-2) y posterior amplificación del gen pre-ARNr 16S mediante PCR cuantitativa. A continuación, la importancia y regulación diferencial de los genes comprendidos dentro de la delección de 16 Kb durante los procesos de invasión celular fueron evaluados a través del análisis transcriptómico de la cepa de referencia de *M. a. paratuberculosis* K-10 tras infección *in vitro* en las líneas celulares THP-1 y MOCL-4.

En resumen, la aplicación de todas las técnicas descritas a lo largo de la tesis varía en función de la finalidad así como de los medios de los que esté dotado el laboratorio en el que se vayan a aplicar. Así, en laboratorios que cuenten con la tecnología de PCR a tiempo real y análisis de las curvas de disociación de alta resolución, la aplicación de las técnicas descritas en el capítulo IV para la diferenciación de los tres tipos de cepas de *M. a. paratuberculosis* o de los diferentes miembros de MAC sería ideal por la rapidez de los resultados y la fácil reproducibilidad de los mismos.

Sin embargo, en aquellos laboratorios que no cuenten con esta tecnología, para la diferenciación de los tres tipos de cepas de *M. a. paratuberculosis* bastaría con la aplicación de una PCR dirigida a las regiones específicas de las cepas del tipo I y III (MAV4125: 306 pb o MAV4126: 303 pb) y de las del tipo III (MAP3584: 633 pb o MAP1435: 265 pb) descritas a nivel genómico mediante el análisis por microarray. Idealmente, la aplicación de una PCR múltiple dirigida a los genes MAV4125 o MAV4126 y MAP3584 diferenciaría los tres tipos de cepas, ya que las cepas del tipo I amplificarían ambos genes, las del tipo II solamente el gen MAP3584 y las del tipo III únicamente los genes MAV4125 o MAV4126.

Finalmente, y en el caso de que se trate de la recomendación de una técnica con fines epidemiológicos para realizar una trazabilidad entre brotes de paratuberculosis en un determinado país o explotación, la aplicación de la técnica de MIRU-VNTR sería recomendable por presentar un alto índice de discriminación a partir de aislados de elevada homogeneidad genética.

Paratuberculosis or Johne's disease is a chronic granulomatous inflammation that mainly affects the gastrointestinal tract of domestic ruminants, although it also affects other animal species. The etiological agent is *M. a. paratuberculosis*, a member of the *Mycobacterium avium* complex.

The main objective of this thesis, which has been compiled in this summary, is the development and application of new rapid molecular tools to characterize *M. a. paratuberculosis*. This research is mainly focused on the description of new methodologies capable of discriminating the most slow-growing phenotypes (types I and III). All of these studies have been conducted with financial support from two projects, AGL2005-07792 (Ministry of Science and Innovation, Spain) and ParaTBTools FP6-2004-FOOD-3B-023106 (European Union).

Traditional molecular techniques, such as PFGE and RFLP-IS900 have divided *M. a. paratuberculosis* into three types; type I (also named "ovine"), type II ("bovine") and type III ("intermediate"). Nonetheless, there are some isolates (especially the most slow-growing phenotypes) that are not typable by these techniques due to DNA quality and quantity requirements. In addition, these techniques are complex and difficult to apply as routine tests to characterize *M. a. paratuberculosis*.

Hence, the deficiency of rapid, inexpensive, high resolution molecular tools expensive, capable of discriminating between the three types of *M. a. paratuberculosis* led us

to this line of research. Initially, we began designing different PCR-based techniques to amplify house-keeping genes, which were then sequenced to detect possible type-specific differences at the nucleotide level. From these genes, *gyrA* and *gyrB*, topoisomerases involved in the regulation of the helicoidal structure of DNA, presented SNPs that were type-specific (I, II and III). At the same time, one of the SNPs present in the *gyrB* gene in type III strains revealed a recognition site for the restriction enzyme *Hpy188III*. The enzymatic digestion of type III strains product (at that moment only distinguishable from type I strains by PFGE and RFLP-IS900) resulted in a different pattern from those of type I and II.

Continuing with this research, we also examined the *inh-A* gene, whose expression product is the enzyme enoyl-acyl carrier protein reductase, involved in the elongation of fatty acids to mycolic acids, also showed type-specific SNPs. Similar to the *gyrB* gene, one of the SNPs present in the sequence of the *inh-A* gene of type III strains constituted a recognition site for the restriction enzyme *SimI*, which produced a different restriction pattern for type III isolates compared to those obtained for types I and II.

Furthermore, we developed another technique based on PCR and sequencing directed to IS900, one of the most widely exploited target regions in *M. a. paratuberculosis* for diagnosis and identification purposes. The analysis of the different IS900 sequences also resulted in type-specific SNPs for each of the types (I, II and III). This finding constitutes another tool for the identification of the three *M. a. paratuberculosis* types from a small DNA quantity, such as DNA recovered from biological samples (blood, tissues, etc.).

Despite the clear division of *M. a. paratuberculosis* into three types, the difficulty of isolation of the most slow-growing phenotypes and the limited geographical distribution of some of the types has resulted in the consideration of just two *M. a. paratuberculosis* types in most of the studies (leaving out type III or intermediate strains). As a result, in collaboration with Saint Georges University (London, United Kingdom), we performed a genomic hybridization comparison using microarray technology on a selection of *M. a. paratuberculosis* isolates obtained from Spain and representing the three types. This study highlighted the genetic differences present between the three types, where it was found that *M. a. paratuberculosis* types I and III showed 62 ORFs homologous to *M. a. hominissuis* 104 genome but divergent from the *M. a. paratuberculosis* K-10 genome.

In addition, the comparison of types I and III strains with the *M. a. paratuberculosis* K-10 genome revealed deletions of two ORFs in the type I strains analyzed and seven ORFs in the type III strains (whereas six were consecutive loci). This previous data served to

optimize PCR-based techniques directed to types I and III specific genomic regions, and constituted another technique to differentiate between these two types. However, the microarray comprises an expensive method that can only be conducted in the correspondent facilities and also requires trained personnel.

Taking this into account, considering the number of laboratories that use real time PCR technology nowadays and in collaboration with the University of Calgary (Canada) we accomplished a novel molecular approach derived from real time PCR principles and the analysis of differences in melting curves. This technique was able to type *M. a. paratuberculosis* isolates in 1 hour and 30 minutes. Complimentary to this study we also applied these principles to discriminate between MAC members with environmental and clinical relevance, especially in the case of immunocompromised patients.

In addition to this, the different outbreaks of paratuberculosis that occur worldwide and the need to establish links between them have created a demand for a rapid molecular technique able to subtype within the *M. a. paratuberculosis* types. For this reason, and complementing previous studies we analyzed different MIRU-VNTR loci in a panel of *M. a. paratuberculosis* isolates of Spanish origin. Consequently, we described a novel locus (VNTR-259) and proposed the standardization of the interpretation of the results in terms of numbers of copies from agarose gels as previously attained for other members of the genus *Mycobacterium*. The combination of loci used in the study (MIRU-2, MIRU-3, VNTR-25, VNTR-32 and VNTR-259) yielded an index of discrimination HGDI of 0.84, a high value indicative of the utility of this technique for the study of the epidemiology of the different outbreaks of the disease. Moreover, this technique was applied for the first time in Spain in other members of MAC different from *M. a. paratuberculosis*, such as *M. a. avium* recovered from birds of prey.

To conclude, the development of these new approaches resulted in the identification, characterization and description of novel type II strains of *M. a. paratuberculosis* from Spanish origin, sampled from Guadarrama goats. These strains revealed a novel deletion of 16 Kb. Included within this deletion, virulence-related operons were identified, such as the mammalian cell entry genes or *mce* among others. To date, efforts have been directed to the creation of *mce* knock-out strains in other members of the genus *Mycobacterium*. The overall result of this study ended in the description of the first natural *mce* mutant strain of *M. a. paratuberculosis* ever reported. The importance of this deletion, that it contains different virulence genes (*mce* genes and genes members of the PE, Proline-

Glutamic acid and PPE, Proline-Proline-Glutamic acid families), was determined by *in vitro* infections in four cell lines (MOCL-4, BOMAC, THP-1 and CACO-2) and quantitative amplification of pre-rRNA 16S gene. Afterwards, the differential regulation of the genes within the 16 Kb region was evaluated by the analysis of the transcriptome of *M. a. paratuberculosis* K-10 (reference strain) after *in vitro* infections in THP-1 and MOCL-4 cell lines.

In summary, the application of the techniques described within this thesis should depend on the purpose of the study and the capabilities of the laboratory where they are to be applied. Therefore, in laboratories with real time PCR and high resolution melt analysis technology, the use of the techniques described in chapter IV to differentiate between *M. a. paratuberculosis* types and MAC members would be ideal due to the speed and reproducibility of this molecular tool.

For those laboratories where the above technology is not available, a PCR targeting specific regions for types I and III strains of *M. a. paratuberculosis* (MAV4125: 306 bp or MAV4126: 303 bp) and type III strains (MAP3584: 633 bp or MAP1435: 265 bp) could be used. Ideally, the application of a multiplex PCR, targeting genes MAV4125 or MAV4126 and MAP3584 would differentiate between the three types. Thus, type I strains would show amplification for both genes, type II for just MAP3584 gene and type III strains just for genes MAV4125 or MAV4126.

Conversely, if the aim of the technique was to establish epidemiological links between paratuberculosis outbreaks in different countries and farms, the use of a MIRU-VNTR typing approach would be useful due to its elevated discriminatory power among highly homogeneous isolates.



Resúmenes de otras publicaciones derivadas de la tesis

Summaries of other publications
derived from the thesis

*“El científico no es aquella persona que da las respuestas correctas, sino aquel que formula
las preguntas adecuadas”*

*“The scientist is not a person who gives the right answers; he's one who asks the right
questions”*

Claude Lévi-Strauss, antropólogo francés

Lista de resúmenes publicados presentados en congresos y proyectos europeos

List of published summaries presented in congresses and European projects

Castellanos E., Álvarez J., de Juan L., Bezos J., Aranaz A., Romero B., Mateos A., Domínguez L. Comparison of three different DNA extraction techniques in *Mycobacterium* spp. 2nd FEMS Congress of European Microbiologists. España, Madrid. Julio, 4-8 de 2006.

Castellanos E., Aranaz A., Bezos J., Moya N., Romero B., Stevenson K., Mateos A., Domínguez L. Single Nucleotide Polymorphisms in *gyrA* and *gyrB* genes between the different types of *M. a.* subspecies *paratuberculosis*. Proyecto Europeo SSPE-CT-2004-501903. Grecia, Atenas. Mayo, 10-12 de 2007.

Castellanos E., de Juan L., Djonne B., Laroucau K., Álvarez J., Mateos A., Domínguez L. Molecular characterization of caprine *M. a. paratuberculosis* strains from different European countries (France, Norway and Spain). Proyecto Europeo SSPE-CT-2004-501903. Grecia, Atenas. Mayo, 10-12 de 2007.

Castellanos E., Álvarez J., Rodríguez S., de Juan L., Aranaz A., Moya N., Stevenson K., Mateos A., Domínguez L. Molecular Characterization of a collection of isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, possible contributing agent in Crohn's disease in humans. 3rd Med-Vet-Net Annual Scientific Meeting. Italia, Lucca, 27-30 de 2007.

Castellanos E., Álvarez J., Aranaz A., Romero B., de Juan L., Bezos J., Rodríguez S., Stevenson K., Mateos M., Domínguez L. Use of Single Nucleotide Polymorphisms in *inhA* gene to classify *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into Types I, II and III. 9^o *Coloquio Internacional de Paratuberculosis*. Japón, Tskuba. 29 octubre- 2 noviembre de 2007.

Bull T., **Castellanos E.**, Linedale R., Gould K., Aranaz A., Hinds J. The MAPAC combined *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies *avium* genome microarray reveals variable duplications of large genomic regions (VSP's) with low GC% flanked by transposable elements. 29^o *Congreso Annual de la Sociedad Europea de Micobacteriología (ESM)*. Bulgaria, Plovdiv. Julio, 6-9 de 2008.

Castellanos E., Rodríguez S., Romero B., de Juan L., Domínguez L., Mateos A., Aranaz A. New genomic tools to characterize *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates. 5th *Med-Vet-Net Annual Scientific Meeting*, España, El Escorial. Junio, 3-6 de 2009.

Castellanos E., de Juan L., Rodríguez S., Bezos J., Romero B., Stevenson K., Mateos A., Domínguez L., Aranaz A. Review of the molecular techniques used to characterize *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates into types I, II and III. *Proyecto Europeo SSPE-CT-2004-501903*. Italia, Turín. Junio, 17-19 de 2009.

Castellanos E., Romero B., Rodríguez S., Bezos J., de Juan L., Mateos A., Domínguez L., Aranaz A. MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* revealed type-specific differences at two component regulatory systems. 10^o *Coloquio Internacional de Paratuberculosis*. USA, Mineápolis. Agosto, 9-14 de 2009.

Castellanos E., Aranaz A., Domínguez L., de Juan L., Mateos A., Linedale L., Bull T. (2009) *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates recovered from infected goats in the central Spain contain deletions of *mce* genes and an increased capacity for persistence in macrophages. 10^o *Coloquio Internacional de Paratuberculosis*. USA, Mineápolis. Agosto, 9-14 de 2009.

Comparación de tres técnicas de extracción de ADN en *Mycobacterium* sp.

Castellanos E., Álvarez J., de Juan L., Bezos J., Arana A., Romero B., Mateos A., Domínguez L.

Departamento de Sanidad Animal, Laboratorio VISAVET, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid.

Las especies pertenecientes al género *Mycobacterium* son ácido-alcohol resistentes y están implicadas en infecciones que afectan al hombre y a los animales. Algunas de estas especies presentan una tasa de crecimiento muy lenta, superando en ocasiones los seis meses y el aislamiento bacteriano de las mismas mediante cultivo es lento y complejo. Todo esto ha fomentado el desarrollo de técnicas de diagnóstico complementarias para su aplicación en el aislamiento directo de las mismas a partir de muestras de tejido. Estas técnicas podrían ser aplicables cuando se requieren resultados rápidos en muestras de mayor importancia como aquellas procedentes de pacientes de Crohn.

Por lo tanto, nosotros desarrollamos tres técnicas diferentes y efectivas, basadas en la aplicación de esferas de circonio y/o reactivos químicos para la extracción directa de ADN. Estas técnicas se aplicaron en muestras de tejidos procedentes de ganado vacuno y rebaños de cabras infectadas con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (agente etiológico de la enfermedad de Johne), *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae* (tuberculosis). La extracción directa de ADN se analizó seguidamente mediante PCR dirigida a secuencias específicas de los genomas de las citadas especies. Los productos de PCR fueron comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. La realización de estas técnicas se evaluó empleando el cultivo bacteriológico como técnica de referencia.

Como conclusión, los mejores resultados se obtuvieron tras el tratamiento combinado de las muestras. Este protocolo supone un método de bajo coste y simple que se podría emplear para un diagnóstico precoz. Los resultados serán discutidos.

Comparison of three different DNA extraction techniques in *Mycobacterium* spp.

Castellanos E., Álvarez J., de Juan L., Bezos J., Arana A., Romero B., Mateos A., Domínguez L.

Departamento de Sanidad Animal, Laboratorio VISAVET, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid.

Mycobacterium spp. are acid-alcohol resistant bacteria involved in human and animal infections, and some of them present slow growing rate up to 6 months. Bacterial isolation by culture is cumbersome and time-consuming. This encourages the development of complementary diagnostic techniques to implement their direct isolation from tissue samples. These techniques could be applied to obtain rapid results within important samples such those from Crohn's disease patients.

Therefore, we have performed three different but effective techniques, based on zirconium beads and/or chemical products for direct DNA extraction. The techniques were applied in tissue samples from bovine herds and caprine flocks infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Johne's disease agent), *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* (tuberculosis). Direct DNA extraction was then analysed by PCR directed to specific sequences included within these species' genomes. PCR products were checked by 2% agarose gel electrophoresis. The performance of these techniques was evaluated using bacteriological culture as gold standard.

To sum up, the best results are obtained after the combined treatment of samples. The protocol is a low-cost and time-saving method that can be used for a fast diagnosis. Our results will be discussed.

Polimorfismos de nucleótido único en los genes *gyrA* y *gyrB* para los distintos tipos de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

Castellanos E.^a, Aranaz A.^a, Bezos J.^a, Moya N.^a, Romero B.^a, Stevenson K.^b, Mateos A.^a, Domínguez L.^a

^a *Departamento de Sanidad Animal, Laboratorio VISAVET, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid.* ^b *Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Penicuik EH26 OPZ, Scotland, UK.*

Los aislados de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) se han clasificado en tres grandes grupos en función de los perfiles moleculares obtenidos mediante PFGE (tipos I, II y III) y RFLP-IS900 (ovino, bovino e intermedio). Sin embargo, estas técnicas en ocasiones son difíciles de llevar a cabo en aquellas cepas que presentan un crecimiento lento o son difíciles de cultivar.

Por ello, estudiamos los genes *gyrA* y *gyrB*, dos dianas fundamentales en estudios filogenéticos. Con este fin, seleccionamos un panel de cepas de los diferentes tipos de Map, obtenidos de diferente hospedador y origen geográfico, para los cuales se analizaron los genes *gyrA* y *gyrB* completos mediante un método de PCR y posterior secuenciación.

Como conclusión pudimos observar que esta herramienta molecular fue capaz de caracterizar las cepas de Map en tres grupos y además los resultados llevaron al desarrollo de una técnica de análisis de PCR-REA, la cual resultó en un método molecular fácil de realizar y rápido.

Single Nucleotide Polymorphisms in *gyrA* and *gyrB* genes between the different types of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

Castellanos E.^a, Arana A.^a, Bezos J.^a, Moya N.^a, Romero B.^a, Stevenson K.^b, Mateos A.^a, Domínguez L.^a

^a Departamento de Sanidad Animal, Laboratorio VISAVET, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid. ^b Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Penicuik EH26 OPZ, Scotland, UK.

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (Map) isolates have been classified into three major groups based on their molecular profiles with PFGE (Type I, II and III) and RFLP-IS900 (sheep, cattle and intermediate). These techniques sometimes are difficult to perform with those strains that present a slow growing rate or are difficult to cultivate.

For this purpose, we have studied *gyrA* and *gyrB* genes, two main targets used in phylogenetic studies. We selected a panel of Map strains from different types, different hosts and geographical origin, that were tested with a PCR-sequencing method directed to complete *gyrA* and *gyrB* genes.

In our results, this molecular tool was able to characterize Map strains into these three groups and the results were susceptible to REA-PCR analysis, thus resulting in a rapid, not cumbersome and easy to perform molecular technique.

**Caracterización molecular de cepas caprinas de *Mycobacterium avium* subsp.
paratuberculosis de diferentes países europeos
(Francia, Noruega y España)**

*Castellanos, E.¹, de Juan, L.¹, Djonne, B.², Laroucau, K.³, Álvarez, J.¹, Mateos, A.¹ and Domínguez, L.¹
Departamento de Sanidad Animal, Laboratorio VISAVET, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de
Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain¹. Section of Animal Health, National Veterinary
Institute (NVI), Ullevålsveien 72, 0407 Oslo, Norway² and Laboratoire d'Etudes et de Recherches en
Pathologie Animale et Zoonoses (LERZAP). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). Rue
Pierre Curie 22. 94703 Maisons-Alfort, France³.*

La paratuberculosis en cabras ocasiona considerables pérdidas económicas debido a la caída en la producción láctea. En esta especie animal se han realizado tan sólo unos pocos estudios epidemiológicos y por lo tanto no existen casi datos sobre la epidemiología de la enfermedad de Johne en cabras. Además, se desconoce la información referente a los tipos de cepas de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) que infectan a los animales en los diferentes países europeos.

El objetivo de este estudio fue el de definir los tipos de cepas presentes en los diferentes países. Para ello se recogieron cepas de Map de rebaños caprinos procedentes de tres países europeos (Francia, Noruega y España) y a continuación se caracterizaron mediante: a) electroforesis en campo pulsado (PFGE); b) una técnica de PCR para distinguir las cepas I/III de las del tipo II (DMC-PCR) y c) un análisis mediante MIRU para diferenciar los diferentes grupos. Los resultados obtenidos con estas técnicas mostraron diferencias significativas entre países y éstas serán discutidas en detalle durante la presentación.

**Molecular characterization of caprine *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* strains from different European countries
(France, Norway and Spain)**

Castellanos, E.¹, de Juan, L.¹, Djonne, B.², Laroucau, K.³, Álvarez, J.¹, Mateos, A.¹ and Domínguez, L.¹
Departamento de Sanidad Animal, Laboratorio VISAVET, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain¹. Section of Animal Health. National Veterinary Institute (NVI), Ullevalsveien 72, 8156 dep, 0033 Oslo, Norway² and Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses (LERZAP). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). Rue Pierre Curie 22. 94703 Maisons-Alfort, France³.

Paratuberculosis in goats causes considerable economic losses mainly due to reduced milk production. Few epidemiological studies have been carried out in this animal species and therefore little is known about the epidemiology of Johne's disease in goats. Furthermore, no information is available regarding the types of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) strains infecting the animals in the different European countries.

The target of the study was to define the types of strains present in the different countries. In this study, a collection of Map strains were collected from caprine flocks from three different European countries (France, Norway and Spain) to characterize the strains present by: a) Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE); b) a PCR technique to distinguish between Types I/III and Type II (DMC-PCR); and c) a MIRU analysis to distinguish the different groups. The results obtained with the different techniques show significant differences between countries and will be discussed in detail during the presentation.

Caracterización molecular de una colección de aislados de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, posible agente contribuyente en la enfermedad de Crohn en personas

Elena Castellanos¹, Julio Álvarez¹, Sabrina Rodríguez¹, Lucía de Juan¹, Alicia Arana¹, Nuria Moya¹, Karen Stevenson², Ana Mateos¹, Lucas Domínguez¹

¹ Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense Madrid, Madrid, Spain, ² Moredun Research Institute, Edinburgh, United Kingdom

En la actualidad se está estudiando el posible papel desempeñado por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*M. a. paratuberculosis*) en la enfermedad de Crohn (una enfermedad en personas que cursa con inflamación intestinal). Por lo tanto, el estudio molecular de esta micobacteria es importante. La electroforesis en campo pulsado (PFGE) y los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) son técnicas ampliamente empleadas y han clasificado los aislados de *M. a. paratuberculosis* en tres grandes grupos: tipo I (tipo ovino), II (tipo bovino) y III (intermedio). El inconveniente principal de estas técnicas son los requerimientos de ADN (alta cantidad y calidad), a veces inalcanzables para algunos de los aislados (especialmente los tipos I y III) dada la dificultad de cultivo de los mismos y de su crecimiento limitado.

Para este estudio se seleccionó un panel de aislados, representantes de los tres tipos de *M. a. paratuberculosis* (previamente caracterizados mediante PFGE y RFLP), obtenidos de diferentes hospedadores y áreas geográficas de España y Escocia. Los aislados se caracterizaron mediante el empleo de tres técnicas moleculares basadas en PCR: tipificación genética basada en varios loci (MLST); repeticiones en tándem de número variable (VNTRs); y unidades repetitivas intergénicas dispersas de micobacterias (MIRUs).

Los datos obtenidos mediante las técnicas de PCR se correspondieron a los resultantes del empleo de las técnicas estandarizadas de PFGE y RFLP.

Las tres técnicas moleculares alternativas resultaron muy útiles en la división y caracterización de los tres grandes grupos de aislados de *M. a. paratuberculosis*. Las principales ventajas de estas herramientas moleculares son: los resultados se obtienen de una manera rápida, solo requieren pequeñas cantidades de ADN, son fáciles de realizar y los datos obtenidos con las herramientas moleculares clásicas son reproducibles mediante estas técnicas.

Molecular characterization of a collection of isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, possible contributing agent in Crohn's disease in humans

Elena Castellanos¹, Julio Álvarez¹, Sabrina Rodríguez¹, Lucía de Juan¹, Alicia Arana¹, Nuria Moya¹, Karen Stevenson², Ana Mateos¹, Lucas Domínguez¹

¹Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense Madrid, Madrid, Spain, ²Moredun Research Institute, Edinburgh, United Kingdom

The possible role of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*M. a. paratuberculosis*) in Crohn's disease (an inflammatory bowel disease in humans) is currently under study. Therefore, the molecular study of these mycobacteria is important. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and restriction fragment length polymorphisms (RFLP) have been widely used to classify *M. a. paratuberculosis* isolates into three major groups: Type I (sheep type), II (cattle type) and III (intermediate). The main disadvantage of these techniques is their requirement for high quantity and quality DNA that, for some isolates (especially Types I and III) is not feasible because they are not easy to cultivate and their growth is limited.

In this study, a panel of *M. a. paratuberculosis* isolates of the three different types (previously characterized by PFGE and RFLP) was selected from different geographic areas in Spain and Scotland and hosts. The isolates were tested using three other molecular techniques based on PCR, such as: multilocus sequence typing (MLST); variable number tandem repeats (VNTRs); and mycobacterial-interspersed repetitive units (MIRUS).

The results obtained by the PCR techniques matched those previously achieved with standardized PFGE and RFLP.

The three alternative molecular techniques were very useful in characterizing *M. a. paratuberculosis* isolates and in helping to divide them into the three major groups. The main advantages of these molecular tools are that: results are obtained rapidly, only a small amount of DNA is required, they are not cumbersome to carry out; and classical results can be replicated.

Uso de los polimorfismos de nucleótido único presentes en el gen *inh-A* para la clasificación de los aislados de *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* en los Tipos I, II y III

Elena Castellanos¹, Julio Álvarez¹, Alicia Arana¹, Beatriz Romero¹, Lucía de Juan¹, Javier Bezos¹, Sabrina Rodríguez¹, Karen Stevenson², Ana Mateos¹, Lucas Domínguez¹

¹ *Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.* ² *International Research Centre, Pentlands Science Park, Moredun Research Institute, Pentlands EH26 OPZ, Scotland, United Kingdom.*

Mycobacterium avium subespecie *paratuberculosis* (*M. a. paratuberculosis*) es el agente etiológico de la paratuberculosis (o enfermedad de Johne), una enfermedad inflamatoria crónica del tracto gastrointestinal que afecta principalmente a rumiantes domésticos y salvajes. Los aislados de *M. a. paratuberculosis* se han clasificado en tres grandes grupos en función del análisis de fragmentos de restricción largos (RFLP, PFGE) y otras técnicas moleculares rápidas basadas en el análisis de los polimorfismos de nucleótido único (SNPs).

En este estudio, el gen *inh-A*, un gen importante en la biosíntesis de ácidos grasos y previamente descrito como polimórfico se analizó para la detección de SNPs en los diferentes tipos de *M. a. paratuberculosis*. Para ello se seleccionó un panel de cepas de *M. a. paratuberculosis*, representante de los diferentes tipos (I, II y III), obtenido de distintos hospedadores (vacas, cabras y ovejas) y orígenes geográficos (España, Escocia y Dinamarca). El gen completo de *inh-A* se amplificó en todas las cepas, se secuenció y posteriormente se comparó para la detección de SNPs.

El análisis de las secuencias del gen *inh-A* fue capaz de permitir la clasificación de todas las cepas de *M. a. paratuberculosis* en los tres tipos I, II y III. Estos resultados se correspondieron con los obtenidos en estudios previos en los que estas cepas a su vez se clasificaron en función de los genes *gyrA* y *gyrB* mediante el análisis de las secuencias. Estos SNPs además se emplearon en el diseño de un análisis de restricción de endonucleasa que permitió la clasificación de los aislados de *M. a. paratuberculosis* en los tres tipos mediante el análisis de PCR-REA, constituyendo una técnica molecular rápida y útil. Por lo tanto, el gen *inh-A* se ha visto que representa una diana valiosa para la diferenciación de los aislados de *M. a. paratuberculosis* con fines epidemiológicos.

Use of single nucleotide polymorphisms in *inh-A* gene to classify *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into Types I, II and III.

Elena Castellanos¹, Julio Álvarez¹, Alicia Arana¹, Beatriz Romero¹, Lucía de Juan¹, Javier Bezos¹, Sabrina Rodríguez¹, Karen Stevenson², Ana Mateos¹, Lucas Domínguez¹

¹ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain. ² International Research Centre, Pentlands Science Park, Moredun Research Institute, Pentlands EH26 OPZ, Scotland, United Kingdom.

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (*M. a. paratuberculosis*) is the causative agent of paratuberculosis (Johne's disease), a chronic inflammatory disease of the gastrointestinal tract that affects mainly livestock and wild ruminants. *M. a. paratuberculosis* isolates have been classified into three major groups by using large restriction fragment analysis (RFLP, PFGE) and rapid molecular techniques based on Single Nucleotide Polymorphisms analysis (SNPs).

In this study the *inh-A* gene, an important gene in fatty acid biosynthesis, and previously classified as polymorphic, was analyzed for the detection of SNPs among the different *M. a. paratuberculosis* types. A panel of *M. a. paratuberculosis* strains from different types (I, II and III), different hosts (cattle, sheep and goat) and geographical origin (Spain, Scotland and Denmark) was selected. The complete *inh-A* gene from all strains was amplified by PCR, sequenced and then compared to detect the presence of SNPs.

The sequencing analysis of the *inh-A* gene was able to classify all *M. a. paratuberculosis* strains into Types I, II and III. These results are in agreement with previous studies in which these strains were classified as well by *gyrA* and *gyrB* genes by using sequencing analysis. The SNPs were also used to design a restriction endonuclease analysis that allowed the classification of all *M. a. paratuberculosis* isolates into the three types with a simple PCR-REA analysis, this resulting in a fast and useful molecular technique. Therefore, the *inh-A* gene has been shown to be a valuable target to differentiate *M. a. paratuberculosis* isolates for epidemiological purposes.

El microarray combinado MAPAC con los genomas de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* subespecie *avium* revela duplicaciones variables de grandes regiones genómicas (VCP'S) con bajo contenido en GC% delimitadas por elementos transportables

Tim Bull¹, Elena Castellanos², Richard Linedale¹, Kate Gould¹, Alicia Arana², Jason Hinds¹

1. Division of Cellular and Molecular Medicine, St. George's University of London, Cranmer Terrace, London SW17 0RE, UK; 2. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Dpto. Sanidad Animal Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

Objetivo del estudio: Investigar los mecanismos involucrados en la variabilidad de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP).

Métodos: Se empleó un microarray de oligonucleótidos de 60-pb (MAPAC), el cual comprendía los genomas de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* subespecie *avium* cepa 104, para realizar estudios de hibridación genómica comparada en un panel de aislados de MAP con colonias de morfologías variables y obtenidos de diferentes hospedadores.

Resultados: El microarray MAPAC fue capaz de definir un grupo de fragmentos polimórficos largos (LSPs) en cada uno de los tres tipos principales de MAP y también LSPs delecionados asociados con la atenuación de cepas vacunales de MAP. Además, en algunas cepas se vieron hasta un total de 17 regiones genómicas variables (VSPs), indicativas de una serie de grandes duplicaciones regionales. Los VSPs constituían subgrupos de LSPs fundamentalmente, con regiones de bajo contenido en GC e inmediatamente delimitadas por secuencias de inserción o integrasas. Dentro de cada cultivo analizado, los VSPs se encontraron presentes sólo en algunas de las colonias, no en todas. La confirmación de los incrementos diferenciales de señal producidos por los VSP en el MAPAC se realizaron mediante PCR cuantitativa en una selección de genes comprendidos dentro de los LSPs (los cuales incluyeron varios determinantes de virulencia y el operón *rrn*). Esto sirvió para establecer asociaciones entre las duplicaciones de VSP y la tasa de crecimiento/morfología de las colonias. Un incremento en la expresión de la transposasa asociada con los VSPs y la presencia de una transposición activa resultó en una alteración significativa del proteoma de MAP que se demostró posteriormente mediante una infección en una línea celular derivada de macrófagos humanos.

Conclusión: El control de la actividad transposasa, posiblemente asociada con la entrada a la célula hospedadora, puede constituir un mecanismo de variación en la plasticidad genómica y el cambio de fenotipo en MAP.

The MAPAC combined *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies *avium* genome microarray reveals variable duplications of large genomic regions (VCP'S) with low GC% flanked by transportable elements

Tim Bull¹, Elena Castellanos², Richard Linedale¹, Kate Gould¹, Alicia Arana², Jason Hinds¹

1. Division of Cellular and Molecular Medicine, St. George's University of London, Cranmer Terrace, London SW17 0RE, UK; 2. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Dpto. Sanidad Animal Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

Purpose of the study: Investigate mechanisms for variability in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP).

Methods: A 60-mer oligonucleotide microarray (MAPAC) covering both genomes of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies *avium* strain 104 was used to perform comparative genomic studies on a panel of MAP isolates with variant morphologies isolated from a variety of hosts.

Results: The MAPAC microarray was able to define a set of large sequence polymorphisms (LSP's) diagnostic for each of the three major types of MAP and deleted LSP's associated with attenuation in MAP vaccine strains. In addition, some strains contained up to 17 genomic regions (VSP's) giving signals suggestive of a series of large genomic regional duplication. VSP's were predominantly subsets of LSP's, with significantly low GC% regions and immediately flanked by insertion sequences or integrases. VSP's were present in only a portion of any one culture. Confirmation of MAPAC differential signal increases was made using quantitative PCR of a selection of genes within VSP's (including several virulence determinants and the *rrn* operon). Associations could be made between VSP duplications and colony growth rate/morphology. An increase in expression of transposase associated with VSP's and active transposition resulting in significant alteration of the MAP proteome was demonstrated after infection into a human macrophage cell line.

Conclusion: The control of transposase activity, possible associated with host cell entry, may be a mechanism for variation in genome plasticity and phenotype switching in MAP.

Nuevas herramientas genómicas para la caracterización de los aislados de

Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis

Elena Castellanos, Sabrina Rodríguez, Beatriz Romero, Lucía de Juan, Lucas Domínguez, Ana Mateos, Alicia Arana

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), UCM, Madrid, Spain.

Mycobacterium avium subespecie *paratuberculosis* (*M. a. paratuberculosis*) es el agente causal de la enfermedad de Johne o la paratuberculosis en muchas especies animales, incluyendo primates, enfermedad crónica debilitante que reduce la productividad y conlleva importantes pérdidas económicas.

Durante muchos años se ha considerado la hipótesis de *M. a. paratuberculosis* como agente asociado al desarrollo de la enfermedad de Crohn en personas, sin embargo aún hoy esta hipótesis está muy discutida y no está completamente aceptada. Hoy en día, todos los esfuerzos se han dirigido a clarificar este hecho y al entendimiento de los mecanismos de patogenia implicados en el desarrollo de la enfermedad. El aislamiento de *M. a. paratuberculosis* es difícil dado los largos periodos de incubación y los requerimientos de cultivo del mismo. Por esta razón, el objetivo de esta investigación fue el desarrollo de nuevos métodos basados en PCR para la caracterización de los aislados de *M. a. paratuberculosis* y dirigidos a sustituir las complejas técnicas actuales que están estandarizadas como el PFGE y el RFLP.

La heterogeneidad genética presente se estudió en un panel de aislados obtenidos de diferentes hospedadores y representantes de los tres tipos de *M. a. paratuberculosis*, tipos I ('tipo ovino'), II ('tipo bovino') y III ('tipo intermedio'). Para este objetivo aplicamos diferentes y novedosas técnicas moleculares como el análisis de la secuencia de inserción IS900, un método de subtipificación basado en el análisis de MIRU-VNTR, y PCR-REA de los genes *gyrB* e *inh-A*. Los resultados obtenidos mediante estas técnicas mostraron la presencia de tres grupos o linajes bien diferenciados dentro *M. a. paratuberculosis*, que facilitarán el entendimiento de la epidemiología y los patrones de distribución de la paratuberculosis.

**New genomic tools to characterize *Mycobacterium avium* subspecies
paratuberculosis isolates**

Elena Castellanos, Sabrina Rodríguez, Beatriz Romero, Lucía de Juan, Lucas Domínguez, Ana Mateos, Alicia Arana

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), UCM, Madrid, Spain.

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (*M. a. paratuberculosis*) is the causative agent of Johne's disease or paratuberculosis in many animal species, including primates, which consist in a chronic wasting condition that reduces productivity and leads to important economic losses.

The hypothesis of *M. a. paratuberculosis* as a contributing agent in the development of Crohn's disease in humans has been taken into consideration for several years, however it still remains controversial. Nowadays, efforts have been directed to clarify this concern and to get an insight into the pathogenic mechanisms implicated during the evolution of the disease. Isolation of *M. a. paratuberculosis* is difficult due to long-incubation periods and culture requirements. For this reason, the purpose of this research was to develop new PCR-based approaches to characterize *M. a. paratuberculosis* isolates, aimed to overcome the current time-consuming techniques that are standardized for this microorganism such as PFGE and RFLP.

Therefore, we studied the genetic heterogeneity among a panel of isolates from different hosts, representing the three *M. a. paratuberculosis* types I ('sheep type'), II ('cattle type') or III ('intermediate type'). For this purpose we applied several novel molecular techniques such as the analysis of the insertion sequence IS900, a subtyping method based on MIRU-VNTR, REA- PCR of *gyrB* and *inh-A* genes. The findings obtained with these techniques highlight the presence of three well-defined clusters or lineages within *M. a. paratuberculosis*, which will help to get a better sense of the epidemiology and distribution patterns of paratuberculosis.

Revisión de las técnicas moleculares empleadas en la caracterización de los aislados de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* de tipo I, II y III

Elena Castellanos^{1, 2}, Lucía de Juan^{1, 2}, Sabrina Rodríguez^{1, 2}, Javier Bezos^{1, 2}, Beatriz Romero^{1, 2}, Karen Stevenson³, Ana Mateos^{1, 2}, Lucas Domínguez^{1, 2} and Alicia Arana^{1, 2}

¹Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain. ²Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. ³Moredun Research Institute (MRI), Division of Control of Bacterial Diseases, Pentlands Science Park, Bush Loan, Penicuik, EH26 OPZ Scotland, UK.

Mycobacterium avium subespecie *paratuberculosis* es el agente etiológico de la enfermedad de Johne o la paratuberculosis, una gastroenteritis crónica que afecta a un amplio rango de hospedadores y está ampliamente distribuida (Cocito y col. 1994). Hay diversos estudios en los que se ha relacionado *M. a. paratuberculosis* con la enfermedad de Crohn, indicando el posible papel de éste como agente zoonótico (Naser y col. 2000; Bull y col. 2003; Naser y col. 2004). Sin embargo, el papel de *M. a. paratuberculosis* como agente microbiano de esta enfermedad está todavía sin dilucidar (Harris y Barletta, 2001; Behr y Hanley, 2008).

El principal rasgo o característica de *M. a. paratuberculosis* es su difícil aislamiento en cultivo dado sus requerimientos nutricionales así como sus largos tiempos de incubación. Hasta la fecha, las cepas de *M. a. paratuberculosis* se han dividido en tres grandes grupos denominados tipo I (también llamado “ovino” o tipo “S”), tipo II (‘bovino’ o tipo ‘C’) y tipo III (‘intermedio’ o ‘T’), aunque algunos estudios incluyen los tipos I y III dentro del tipo “ovino” (Whittington y col. 2001; Collins y col. 2002). Esta clasificación en dos o tres grupos se ha basado en técnicas de caracterización molecular como el IS900-RFLP (Pavlik y col. 1999), la electrophoresis en campo pulsado (PFGE) (Stevenson y col. 2002, de Juan y col. 2005), PCR- IS1311 con la enzima *HinfI* (Marsh y col. 1999), DMC-PCR (Collins y col. 2002), RDA-PCR (Dohmann y col. 2003), análisis de restricción enzimática y PCR (PCR-REA) del gen *gyrB* (Castellanos y col. 2007), PCR-REA de *inh-A* (Castellanos y col. 2008), PCR y electrophoresis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) de MAP1506 (Griffiths y col. 2008), PCR-secuenciación del gen *recF* (Turenne y col. 2008), PCR-secuenciación de IS900 (Castellanos y col. 2009), e hibridación genómica comparada (CGH) (Castellanos y col. 2009).

Por esto, en este trabajo hemos resumido las técnicas moleculares disponibles capaces de discriminar entre los diferentes grupos de *M. a. paratuberculosis* (tipos I, II y III), comparando sus características principales y reflejando sus posibles ventajas e inconvenientes. En resumen, estas técnicas han demostrado la presencia de dos/tres grupos o linajes en *M. a. paratuberculosis*, sin embargo la nomenclatura y subdivisión en grupos es controvertida y algunos autores consideran la existencia de dos grupos principales, de los cuales los tipos I y III se incluyen dentro del tipo “ovino” (Whittington y col. 2001; Collins y col. 2002). Por lo tanto, sería necesario la secuenciación completa de los genomas de las cepas de los tipos I y III de *M. a. paratuberculosis* para así clarificar la taxonomía de los linajes.

Review of the molecular techniques used to characterize *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates into types I, II and III

Elena Castellanos^{1, 2}, Lucía de Juan^{1, 2}, Sabrina Rodríguez^{1, 2}, Javier Bezos^{1, 2}, Beatriz Romero^{1, 2}, Karen Stevenson³, Ana Mateos^{1, 2}, Lucas Domínguez^{1, 2} and Alicia Arana^{1, 2}

¹Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain. ²Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. ³Moredun Research Institute (MRI), Division of Control of Bacterial Diseases, Pentlands Science Park, Bush Loan, Penicuik, EH26 OPZ Scotland, UK.

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* is the etiological agent of Johne's disease or paratuberculosis, a chronic gastroenteritis that is affecting a broad range of hosts and is world-wide distributed (Cocito et al. 1994). There are also several studies that link *M. a. paratuberculosis* to Crohn's disease, indicating its possible role as a zoonotic agent (Naser et al. 2000; Bull et al. 2003; Naser et al. 2004). However, whether *M. a. paratuberculosis* is the microbial agent of this disease still remains unclear (Harris and Barletta, 2001; Behr and Hanley, 2008).

The main feature of *M. a. paratuberculosis* is its difficult isolation due to long-incubation periods and culture requirements. Up to date *M. a. paratuberculosis* strains have been divided into three clusters named type I (also named as 'sheep' or 'S' type), type II ('cattle' or 'C' type) and type III ('intermediate' or 'I'), albeit some studies include types I and III in the 'sheep' type (Whittington et al. 2001; Collins et al. 2002). This two-cluster or three-cluster classification is based on molecular-characterization techniques such as IS900-RFLP (Pavlik et al. 1999), Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (Stevenson et al. 2002; de Juan et al. 2005), IS1311-PCR with *Hinf*I (Marsh et al. 1999), DMC-PCR (Collins et al. 2002), RDA-PCR (Dohmann et al. 2003), restriction enzyme analysis PCR (PCR-REA) of *gyrB* (Castellanos et al. 2007), PCR-REA of *inh-A* (Castellanos et al. 2008), PCR and denaturing gradient gel electrophoreses (DGGE) of MAP1506 (Griffiths et al. 2008), PCR-sequencing of *recF* (Turenne et al. 2008), PCR-sequencing of IS900 (Castellanos et al. 2009) and comparative genomic hybridization (CGH) (Castellanos et al. 2009).

Therefore, in this work we summarise these available molecular techniques that are able to discriminate among the clusters of *M. a. paratuberculosis* (types I, II and III), comparing their main characteristics and reflecting their possible advantages and disadvantages. To sum

up, these techniques have highlighted the presence of two/three clusters or lineages within *M. a. paratuberculosis*, however its nomenclature and subdivision into groups is still controversial, and some authors consider the existence of two main groups, whereas types I and III are included into the ‘sheep’ type (Cocito et al. 1994; Whittington et al. 2001). Therefore, ideally it would be necessary to perform whole-genome sequencing of *M. a. paratuberculosis* types I and III to further clarify the taxonomy of the lineages.

El genotipado de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mediante MIRU-VNTR reveló diferencias específicas de cada tipo en sistemas reguladores de dos componentes

Elena Castellanos, Beatriz Romero, Sabrina Rodríguez, Javier Bezos, Lucía de Juan, Ana Mateos, Lucas

Domínguez, Alicia Arana

Animal Health Surveillance Center (VISAVET), Complutense University of Madrid (UCM), Animal Health

Department. Veterinary School. UCM, Spain

En este estudio se genotipó una colección de aislados españoles de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mediante la combinación de seis loci con estructura de unidades repetitivas dispersas de micobacterias (MIRU) y repeticiones en tándem de número variable (VNTR); MIRU-2, MIRU-3 (Bull y col. 2003), VNTR-25, VNTR-32, VNTR-292 (Thibault y col. 2007) y VNTR-259 (en este estudio). Esta investigación estuvo enmarcada dentro del proyecto europeo ParaTBtools.

Para esta finalidad, analizamos un total de 70 aislados de *M. a. paratuberculosis* del tipo II y III, obtenidos de rumiantes domésticos (cabras y vacas) y dos aislados de animales salvajes (gamo- *Dama dama*- y muflón- *Ovis orientalis musimon*) aislados de un total de 22 localizaciones españolas durante a lo largo de un período de nueve años.

La combinación de loci MIRU-VNTR seleccionada diferenció 17 variantes alélicas en la población de aislados de *M. a. paratuberculosis*, con un índice de discriminación (D) resultante de 0,82. Interesante fue el hallazgo de diferencias específicas para cada uno de los tipos de *M. a. paratuberculosis* incluidos y observadas en el número de repeticiones del MIRU-3, localizado entre los genes *senX3* y *regX3*, componentes de un sistema regulador con un papel en la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* (Magdalena y col. 1998). Además, también se obtuvo un número de repeticiones específicas para los tipos de *M. a. paratuberculosis* en el locus novel VNTR-259, que al igual que en el caso del MIRU-3, estaba localizado entre un sistema regulador de dos componentes, *AfsQ1/AfsQ2*, el cual tiene un papel en la regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces* (Shu y col. 2009).

Referencias

- Bull, T.J., Sidi-Boumedine, K., McMinn, E.J., Stevenson, K., Pickup, R., y Hermon-Taylor, J. (2003) Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Mol Cell Probes* **17**: 157-164.
- Magdalena, J., Supply, P., y Locht, C., (1998) Specific differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* **36**: 2471-2476.
- Shu, D., Chen, L., Wang, W., Yu, Z., Ren, C., Zhang, W., Yang, S., Lu, Y., y Jiang, W. (2009) *AfsQ1-Q2-sigQ* is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**: 1149-1160.

MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* revealed Type-specific differences at two component regulatory systems

Elena Castellanos, Beatriz Romero, Sabrina Rodríguez, Javier Bezos, Lucía de Juan, Ana Mateos, Lucas Domínguez, Alicia Arana

Animal Health Surveillance Center (VISAVET), Complutense University of Madrid (UCM), Animal Health Department. Veterinary School. UCM, Spain

In this report, we genotyped a collection of Spanish *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates with a combination of six mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) and variable number tandem repeats (VNTR) loci; MIRU-2, MIRU-3 (Bull et al. 2003), VNTR-25, VNTR-32, VNTR-292 (Thibault et al. 2007) and VNTR-259 (this study). This research forms part of the EU project ParaTBtools.

For this purpose we screened 70 *M. a. paratuberculosis* Type II and III isolates, obtained from domestic livestock (goats and cattle) and two isolates recovered from wild animal species (fallow deer- *Dama dama*- and mouflon- *Ovis orientalis musimon*) throughout 22 different Spanish localities in a nine-year period.

The selected combination of MIRU-VNTR loci differentiated 17 different allelic variants within this population of *M. a. paratuberculosis* isolates, with a resulting discriminatory index (D) of 0.82. An interesting feature was the *M. a. paratuberculosis* Type-specific differences observed at the number of repeats at MIRU-3, located between genes *SenX3* and *RegX3*, components of a regulatory system with a role in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* (Magdalena et al. 1998). In addition, *M. a. paratuberculosis* type-specific number of tandem repeats was also obtained for the novel locus VNTR-259, which as in the case of MIRU-3, was located between a two component regulatory system, *AfsQ1/AfsQ2*, which has a role in the regulation of the antibiotic production strategies in *Streptomyces* (Shu et al. 2009)

Reference list

- Bull, T.J., Sidi-Boumedine, K., McMinn, E.J., Stevenson, K., Pickup, R., y Hermon-Taylor, J. (2003) Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Mol Cell Probes* **17**: 157-164.
- Magdalena, J., Supply, P., y Locht, C., (1998) Specific differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* **36**: 2471-2476.
- Shu, D., Chen, L., Wang, W., Yu, Z., Ren, C., Zhang, W., Yang, S., Lu, Y., y Jiang, W. (2009) *AfsQ1-Q2-sigQ* is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**: 1149-1160.

Aislados de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* procedentes de cabras infectadas en la zona centro de España contienen deleciones en los genes *mce* y una elevada capacidad de persistencia en macrófagos

Elena Castellanos, Alicia Arana, Lucas Domínguez, Lucía de Juan, Ana Mateos, Richard Linedale, Tim John

Bull

Animal Health Surveillance Center (VISAVET), Complutense University of Madrid (UCM), Animal Health Department. Veterinary School. UCM, Spain; Division of Cellular and Molecular Medicine. St. George's University of London, United Kingdom

En este estudio de hibridación genómica comparada (CGH) se empleó el microarray MAPAC de ParaTBtools para analizar aislados de MAP procedentes de un rebaño caprino de España. Estos animales presentaban ciertos rasgos histopatológicos, entre los cuales se incluían la presencia de un infiltrado de moderado a severa compuesto por linfocitos y un alto número de macrófagos con una baja carga bacteriana en su citoplasma, determinada esta última mediante la tinción de Ziehl-Neelsen.

El análisis de CGH reveló una deleción novel, constituida por 19 ORFs consecutivos entre los cuales se incluían un operón completo de genes *mce*, genes de la familia PE/PPE, un regulador transcripcional y otros genes con funciones putativas o desconocidas. Los resultados se confirmaron mediante PCR y posterior secuenciación. Además, también se analizó mediante esta PCR un panel de 97 aislados españoles de MAP, que reveló otros 53 aislados con la misma deleción. El análisis epidemiológico de éstos correlacionó los aislados de MAP con esta deleción con rebaños entre los cuales se había producido una transferencia de animales en el pasado.

También se realizaron infecciones celulares en una línea de macrófagos en paralelo con un aislado *mce* negativo (MAP 464) y un aislado de referencia (MAP K-10). Como resultado se observó un aumento significativo en la persistencia intracelular de la cepa MAP 464. También se presentarán, más estudios en lo referente a la expresión diferencial de los genes *mce* en MAP 464 y MAP K-10.

***Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates recovered from infected goats in the central Spain contain deletions of *mce* genes and an increased capacity for persistence in macrophages**

Elena Castellanos, Alicia Arana, Lucas Domínguez, Lucía de Juan, Ana Mateos, Richard Linedale, Tim John Bull

Animal Health Surveillance Center (VISAVET), Complutense University of Madrid (UCM), Animal Health Department. Veterinary School. UCM, Spain; Division of Cellular and Molecular Medicine. St. George's University of London, United Kingdom

This study used the ParaTBtools MAPAC microarray to perform comparative genomic hybridization (CGH) on MAP isolates recovered from a goat herd in Spain. These animals presented unusual features on histopathological investigation including moderate to severe diffuse lymphocytic infiltration with a heavy macrophage load but a very low cytoplasmic bacterial load as determined by Ziehl-Neelsen staining.

CGH analysis revealed a novel deletion, consisting of 19 consecutive ORFs which included a complete *mce* gene operon, *PE/PPE* family genes, a transcriptional regulator and several other genes with either putative or unknown function. Findings were confirmed by a PCR-based approach and sequencing. A panel of 97 Spanish MAP isolates was also screened using this PCR-based approach revealing 53 isolates containing the same deleted region. Epidemiological analysis correlated *mce* negative MAP isolates with herds having a history of animal transfer.

Parallel infections of a representative *mce* negative isolate (MAP 464) and a reference isolate (MAP K-10) into a macrophage cell line showed a significant increase in intracellular persistence associated with MAP 464. Further studies of differential *mce* expression between MAP 464 and MAP K-10 will also be presented.

Referencias bibliográficas

Reference list

Abadia, E., Sequera, M., Ortega, D., Mendez, M.V., Escalona, A., Da Mata, O. y col. (2009) *Mycobacterium tuberculosis* ecology in Venezuela: epidemiologic correlates of common spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR-24. *BMC Infect Dis* **9**: 122.

Ablordey, A., Swings, J., Hubans, C., Chemlal, K., Loch, C., Portaels, F., y Supply, P. (2005) Multilocus variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol* **43**: 1546-1551.

Abubakar, I., Myhill, D.J., Hart, A.R., Lake, I.R., Harvey, I., Rhodes, J.M. y col. (2007) A case-control study of drinking water and dairy products in Crohn's Disease, further investigation of the possible role of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Am J Epidemiol* **165**: 776-783.

Adekambi, T., Berger, P., Raoult, D., y Drancourt, M. (2006) *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 133-143.

Adekambi, T., Stein, A., Carvajal, J., Raoult, D., y Drancourt, M. (2006) Description of *Mycobacterium conceptionense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum* group organism isolated from a posttraumatic osteitis inflammation. *J Clin Microbiol* **44**: 1268-1273.

Adekambi, T., Reynaud-Gaubert, M., Greub, G., Gevaudan, M.J., La Scola, B., Raoult, D., y Drancourt, M. (2004) Amoebal coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *J Clin Microbiol* **42**: 5493-5501.

Affolabi, D., Anyo, G., Faihun, F., Sanoussi, N., Shamputa, I.C., Rigouts, L. y col. (2009) First molecular epidemiological study of tuberculosis in Benin. *Int J Tuberc Lung Dis* **13**: 317-322.

Aguado, M., y Blanco, M. (2007) DNA microarrays in microbiology. *RCCV* **1**: 125-134.

Aho, A.D., McNulty, A.M., y Coussens, P.M. (2003) Enhanced expression of interleukin-1 α and tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect Immun* **71**: 6479-6486.

Akhtar, P., Singh, S., Bifani, P., Kaur, S., Srivastava, B.S., y Srivastava, R. (2009) Variable-number tandem repeat 3690 polymorphism in Indian clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and its influence on transcription. *J Med Microbiol* **58**: 798-805.

Al-Shamali, M., Khan, I., Al-Nakib, B., Al-Hassan, F., y Mustafa, A.S. (1997) A multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Scand J Gastroenterol* **32**: 819-823.

Alexander, D.C., Guthrie, J.L., Pyskir, D., Maki, A., Kurepina, N., Kreiswirth, B.N. y col. (2009) *Mycobacterium tuberculosis* in Ontario, Canada: Insights from IS6110 restriction fragment length polymorphism and mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping. *J Clin Microbiol* **47**: 2651-2654.

Alexander, D.C., Turenne, C.Y., y Behr, M.A. (2009) Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Bacteriol* **191**: 1018-1025.

Ali, A., Hasan, Z., Tanveer, M., Siddiqui, A.R., Ghebremichael, S., Kallenius, G., y Hasan, R. (2007) Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Central Asian Strain 1 using mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *BMC Microbiol* **7**: 76.

Alland, D., Whittam, T.S., Murray, M.B., Cave, M.D., Hazbon, M.H., Dix, K. y col. (2003) Modeling bacterial evolution with comparative-genome-based marker systems: application to *Mycobacterium tuberculosis* evolution and pathogenesis. *J Bacteriol* **185**: 3392-3399.

Allix, C., Walravens, K., Saegerman, C., Godfroid, J., Supply, P., y Fauville-Dufaux, M. (2006) Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *J Clin Microbiol* **44**: 1951-1962.

Allix-Beguec, C., Fauville-Dufaux, M., y Supply, P. (2008) Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **46**: 1398-1406.

Alonso-Hearn, M., Eckstein, T.M., Sommer, S., y Bermudez, L.E. (2009) A *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* LuxR regulates cell envelope and virulence. *Innate Immun.* En prensa.

Alonso-Hearn, M., Molina, E., Geijo, M., Vazquez, P., Sevilla, I., Garrido, J.M., y Juste, R.A. (2009) Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from muscle tissue of naturally infected cattle. *Foodborne Pathog Dis* **6**: 513-518.

Alonso-Rodríguez, N., Martínez-Lirola, M., Herranz, M., Sánchez-Benítez, M., Barroso, P., Bouza, E., y García de Viegma, D. (2008) Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiol* **8**: 34.

Álvarez, J., Castellanos, E., de Juan, L., Romero, B., Bezos, J., Rodríguez, S. y col. (2008) Characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates by Large Sequence Polymorphisms (LSP) detection and *hsp65* sequencing. Libro de resúmenes del 9º Coloquio Internacional de Paratuberculosis. 3-5.

Álvarez, J., García, I.G., Aranaz, A., Bezos, J., Romero, B., de Juan, J.L. y col. (2008) Genetic diversity of *Mycobacterium avium* isolates recovered from clinical samples and from the environment: molecular characterization for diagnostic purposes. *J Clin Microbiol* **46**: 1246-1251.

Ameni, G., Aseffa, A., Sirak, A., Engers, H., Young, D.B., Hewinson, R.G. y col. (2007) Effect of skin testing and segregation on the prevalence of bovine tuberculosis, and molecular typing of *Mycobacterium bovis*, in Ethiopia. *Vet Rec* **161**: 782-786.

Amonsin, A., Li, L.L., Zhang, Q., Bannantine, J.P., Motiwala, A.S., Sreevatsan, S., y Kapur, V. (2004) Multilocus short sequence repeat sequencing approach for differentiating among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* **42**: 1694-1702.

Aranaz, A., Liebana, E., Gomez-Mampaso, E., Galan, J.C., Cousins, D., Ortega, A. y col. (1999) *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 3**: 1263-1273.

- Arnold, C., Westland, L., Mowat, G., Underwood, A., Magee, J., y Gharbia, S. (2005) Single-nucleotide polymorphism-based differentiation and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* from isolates or directly from sputum. *Clin Microbiol Infect* **11**: 122-130.
- Aronson, T., Holtzman, A., Glover, N., Boian, M., Froman, S., Berlin, O.G. y col. (1999) Comparison of large restriction fragments of *Mycobacterium avium* isolates recovered from AIDS and non-AIDS patients with those of isolates from potable water. *J Clin Microbiol* **37**: 1008-1012.
- Arruda, S., Bomfim, G., Knights, R., Huima-Byron, T., y Riley, L.W. (1993) Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science* **261**: 1454-1457.
- Atala, y Akcay, E. (2001) Türkiye genelinde sgr paratuberkulozu prevalansnn ELISA ile araştırılması. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* **12**: 39-48.
- Ausina, V., Luquin, M., García, B.M., Lancelle, M.A., Levy-Frebault, V., Belda, F., y Prats, G. (1992) *Mycobacterium alvei* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 529-535.
- Bachelier, S., Clement, J.M., Hofnung, M., y Gilson, E. (1997) Bacterial interspersed mosaic elements (BIMEs) are a major source of sequence polymorphism in *Escherichia coli* intergenic regions including specific associations with a new insertion sequence. *Genetics* **145**: 551-562.
- Baker, L., Brown, T., Maiden, M.C., y Drobniewski, F. (2004) Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis* **10**: 1568-1577.
- Balseiro, A., Prieto, J.M., Espi, A., Perez, V., y García Marin, J.F. (2003) Presence of focal and multifocal paratuberculosis lesions in mesenteric lymph nodes and the ileocaecal valve of cattle positive to the tuberculin skin test. *Vet J* **166**: 210-212.
- Bang, D., Herlin, T., Stegger, M., Andersen, A.B., Torkko, P., Tortoli, E., y Thomsen, V.O. (2008) *Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 2398-2402.
- Bannantine, J.P., y Stabel, J.R. (2000) *HspX* is present within *Mycobacterium paratuberculosis*-infected macrophages and is recognized by sera from some infected cattle. *Vet Microbiol* **76**: 343-358.
- Bannantine, J.P., Baechler, E., Zhang, Q., Li, L., y Kapur, V. (2002) Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *J Clin Microbiol* **40**: 1303-1310.
- Bannantine, J.P., Huntley, J.F., Miltner, E., Stabel, J.R., y Bermudez, L.E. (2003) The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *Microbiology* **149**: 2061-2069.
- Bannantine, J.P., Hansen, J.K., Paustian, M.L., Amonsin, A., Li, L.L., Stabel, J.R., y Kapur, V. (2004) Expression and immunogenicity of proteins encoded by sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* **42**: 106-114.
- Banu, S., Gordon, S.V., Palmer, S., Islam, M.R., Ahmed, S., Alam, K.M. y col. (2004) Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Bangladesh and prevalence of the Beijing strain. *J Clin Microbiol* **42**: 674-682.
- Barlow, R.E., Gascoyne-Binzi, D.M., Gillespie, S.H., Dickens, A., Qamer, S., y Hawkey, P.M. (2001) Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high- and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* **39**: 2453-2457.
- Bartos, M., Hlozek, P., Svastova, P., Dvorska, L., Bull, T., Matlova, L. y col. (2006) Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards. *J Microbiol Methods* **64**: 333-345.

- Bauerfeind, R., Benazzi, S., Weiss, R., Schliesser, T., Willems, H., y Baljer, G. (1996) Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS900. *J Clin Microbiol* **34**: 1617-1621.
- Beard, P.M., Daniels, M.J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D. y col. (2001) Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J Clin Microbiol* **39**: 1517-1521.
- Behr, M.A., y Hanley, J. (2008) Antimycobacterial therapy for Crohn's disease: a reanalysis. *Lancet Infect Dis* **8**: 344.
- Ben Salah, I., Cayrou, C., Raoult, D., y Drancourt, M. (2009) *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurbonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 2803-2808.
- Bergey, D.H., Harrison, F.C., Breed, R.S., Hammer, B.W., y Huntoon, F.M. (1923) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1st ed. Baltimore, The Williams & Wilkins Co. 1-442.
- Bhide, M., Chakurkar, E., Tkacikova, L., Barbuddhe, S., Novak, M., y Mikula, I. (2006) IS900-PCR-based detection and characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from buffy coat of cattle and sheep. *Vet Microbiol* **112**: 33-41.
- Biet, F., Boschioli, M.L., Thorel, M.F., y Guilloteau, L.A. (2005) Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res* **36**: 411-436.
- Bifani, P.J., Mathema, B., Liu, Z., Moghazeh, S.L., Shopsis, B., Tempalski, B. y col. (1999) Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *JAMA* **282**: 2321-2327.
- Billamas, P., Smittipat, N., Juthayothin, T., Thong-On, A., Yamada, N., Yanai, H., y Palittapongarnpim, P. (2007) Evolution of some variable-number tandem repeat loci among a group of Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **87**: 498-501.
- Boddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blocker, H., y Bottger, E.C. (1990) Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* **28**: 1751-1759.
- Boelaert, F., Walravens, K., Biron, P., Vermeersch, J.P., Berkvens, D., y Godfroid, J. (2000) Prevalence of paratuberculosis (John's disease) in the Belgian cattle population. *Vet Microbiol* **77**: 269-281.
- Bojalil, L.F., Cerbon, J., y Trujillo, A. (1962) Adansonian classification of mycobacteria. *J Gen Microbiol* **28**: 333-346.
- Bonicke, R., y Juhasz, S.E. (1964) Beschreibung der neuen Species *Mycobacterium vaccae* n. sp. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. **192**: 133-135.
- Bonicke, R., y Juhasz, S.E. (1965) *Mycobacterium diernhoferi* n.sp., a new *Mycobacterium* species common in the environment of cattle. *Zentralbl Bakteriolog Orig* **197**: 292-294.
- Bosshard, C., Stephan, R., y Tasara, T. (2006) Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *J Food Prot* **69**: 1662-1667.
- Bottcher, J., y Gangl, A. (2004) *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* combined serological testing and classification of individual animals and herds. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**: 443-448.
- Bottger, E.C., Hirschel, B., y Coyle, M.B. (1993) *Mycobacterium genavense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 841-843.
- Brennan, P.J. (2003) Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **83**: 91-97.

- Brey, B.J., Radcliff, R.P., Clark, D.L., Jr., y Ellingson, J.L. (2006) Design and development of an internal control plasmid for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using real-time PCR. *Mol Cell Probes* **20**: 51-59.
- Brimacombe, M., Hazbon, M., Motiwala, A.S., y Alland, D. (2007) Antibiotic resistance and single-nucleotide polymorphism cluster grouping type in a multinational sample of resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 4157-4159.
- Brown, B.A., Springer, B., Steingrube, V.A., Wilson, R.W., Pfyffer, G.E., García, M.J. y col. (1999) *Mycobacterium wolinskyi* sp. nov. and *Mycobacterium goodii* sp. nov., two new rapidly growing species related to *Mycobacterium smegmatis* and associated with human wound infections: a cooperative study from the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**: 1493-1511.
- Buergelt, C.D., Hall, C., McEntee, K., y Duncan, J.R. (1978) Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet Pathol* **15**: 196-207.
- Bull, T.J., Hermon-Taylor, J., Pavlik, I., I, El-Zaatari, F., y Tizard, M. (2000) Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology* **146 (Pt 12)**: 3285.
- Bull, T.J., McMinn, E.J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P. y col. (2003) Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol* **41**: 2915-2923.
- Bull, T.J., Sidi-Boumedine, K., McMinn, E.J., Stevenson, K., Pickup, R., y Hermon-Taylor, J. (2003) Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Mol Cell Probes* **17**: 157-164.
- Bull, T.J., Linedale, R., Hinds, J., y Hermon-Taylor, J. (2009) A rhodanine agent active against non-replicating intracellular *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Gut Pathog* **1**: 25.
- Butler, W.R., O'Connor, S.P., Yakus, M.A., Smithwick, R.W., Plikaytis, B.B., Moss, C.W. y col. (1993) *Mycobacterium celatum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 539-548.
- Cangelosi, G.A., Do, J.S., Freeman, R., Bennett, J.G., Semret, M., y Behr, M.A. (2006) The two-component regulatory system *mtrAB* is required for morphotypic multidrug resistance in *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 461-468.
- Carrigan, M.J., y Seaman, J.T. (1990) The pathology of Johne's disease in sheep. *Aust Vet J* **67**: 47-50.
- Casal, M., y Calero, J.R. (1974) *Mycobacterium gadium* sp. nov. a new species of rapid-growing scotochromogenic mycobacteria. *Tubercle* **55**: 299-308.
- Casali, N., y Riley, L.W. (2007) A phylogenomic analysis of the Actinomycetales mce operons. *BMC Genomics* **8**: 60.
- Castellanos, E., Álvarez, J., Aranaz, A., Romero, B., de Juan, L., Bezos, J. y col. (2008) Use of Single Nucleotide Polymorphisms in *inh-A* gene to characterize *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into Types I, II and III. Libro de resúmenes del 9º Coloquio Internacional de Paratuberculosis, 6-8.
- Castellanos, E., Aranaz, A., Romero, B., de Juan L., Álvarez, J., Bezos, J. y col. (2007) Polymorphisms in *gyrA* and *gyrB* genes among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III isolates. *J Clin Microbiol* **45**: 3439-3442.
- Castellanos, E., Aranaz, A., de Juan, L., Álvarez, J., Rodríguez, S., Romero, B. y col. (2009) Single nucleotide polymorphisms in the IS900 sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are strain type specific. *J Clin Microbiol* **47**: 2260-2264.

- Castellanos, E., Aranaz, A., Gould, K.A., Linedale, R., Stevenson, K., Álvarez, J. y col. (2009) Discovery of stable and variable differences in the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III genomes by pan-genome microarray analysis. *Appl Environ Microbiol* **75**: 676-686.
- Castellanos, E., Romero, B., Rodríguez, S., de Juan, L., Bezos, J., Mateos, A. y col. (2010) Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Types II and III isolates by a combination of MIRU-VNTR loci. *Vet Microbiol*. En prensa.
- Castets, M., y Sarrat, H. (1969) Experimental study of the virulence of *Mycobacterium africanum* (preliminary note). *Bull Soc Med Afr Noire Lang Fr* **14**: 693-696.
- Cavusoglu, C., Karatas, E., y Soyler, I. (2007) Genotyping of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat (MIRU-VNTR) analysis. *Mikrobiyol Bul* **41**: 385-393.
- Cernicchiaro, N., Wells, S.J., Janagama, H., y Sreevatsan, S. (2008) Influence of type of culture medium on characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subtypes. *J Clin Microbiol* **46**: 145-149.
- Cetinkaya, B., Egan, K., Harbour, D.A., y Morgan, K.L. (1996) An abattoir-based study of the prevalence of subclinical Johne's disease in adult cattle in south west England. *Epidemiol Infect* **116**: 373-379.
- Cetinkaya, A., Muz, H.B., Ertas, H., Öngör, I.Y., Sezen, y Gülcü, H.B. (2000) Sut ineklerinde paratuberkuloz prevalansın polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması. *Türk Veterinerlik ve Hayvanlık Dergisi* **24**: 371-379.
- Chacon, O., Bermudez, L.E., y Barletta, R.G. (2004) Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annu Rev Microbiol* **58**: 329-363.
- Chai, L.Q., Li, W.M., Li, L., Dai, Z.J., Bai, D.P., Zhang, L. y col. (2007) Study on the genotype of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from hospitals in Tianjin. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* **28**: 785-788.
- Chakravorty, S., Aladegbami, B., Motiwala, A.S., Dai, Y., Safi, H., Brimacombe, M. y col. (2008) Rifampin resistance, Beijing-W clade-single nucleotide polymorphism cluster group 2 phylogeny, and the Rv2629 191-C allele in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* **46**: 2555-2560.
- Chamberlin, W., Ghobrial, G., Chehtane, M., y Naser, S.A. (2007) Successful treatment of a Crohn's disease patient infected with bacteremic *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Gastroenterol* **102**: 689-691.
- Chamoiseau, G. (1973) "*Mycobacterium farcinogenes*" causal agent of bovine farcy in Africa (author's transl). *Ann Microbiol (Paris)* **124**: 215-222.
- Chanchaem, W., y Palittapongarnpim, P. (2002) A variable number of tandem repeats result in polymorphic alpha-isopropylmalate synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **82**: 1-6.
- Chatterjee, D., Hunter, S.W., McNeil, M., y Brennan, P.J. (1992) Lipoarabinomannan. Multiglycosylated form of the mycobacterial mannosylphosphatidylinositols. *J Biol Chem* **267**: 6228-6233.
- Chatterjee, D., Lowell, K., Rivoire, B., McNeil, M.R., y Brennan, P.J. (1992) Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains. *J Biol Chem* **267**: 6234-6239.
- Chaudhuri, J.D. (2005) Genes arrayed out for you: the amazing world of microarrays. *Med Sci Monit* **11**: RA52-RA62.
- Chiodini, R.J. (1989) Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin Microbiol Rev* **2**: 90-117.
- Chiodini, R.J., van Kruiningen, H.J., y Merkal, R.S. (1984) Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet* **74**: 218-262.

- Chiodini, R.J., van Kruiningen, H.J., Thayer, W.R., Merkal, R.S., y Coutu, J.A. (1984) Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **29**: 1073-1079.
- Choy, E., Whittington, R.J., Marsh, I., Marshall, J., y Campbell, M.T. (1998) A method for purification and characterisation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the intestinal mucosa of sheep with Johne's disease. *Vet Microbiol* **64**: 51-60.
- Clark, D.L., Jr., Anderson, J.L., Koziczowski, J.J., y Ellingson, J.L. (2006) Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Mol Cell Probes* **20**: 197-202.
- Clarke, C.J. (1997) The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol* **116**: 217-261.
- Cloud, J.L., Meyer, J.J., Pounder, J.I., Jost, K.C., Jr., Sweeney, A., Carroll, K.C., y Woods, G.L. (2006) *Mycobacterium arupense* sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 1413-1418.
- Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., de Kesel, M., Poupart, P., y Vannuffel, P. (1994) Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev* **7**: 328-345.
- Coetsier, C., Vannuffel, P., Blondeel, N., Denef, J.F., Cocito, C., y Gala, J.L. (2000) Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin- fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J Clin Microbiol* **38**: 3048-3054.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D. y col. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- Collins, D.M., Cavaignac, S., y de Lisle, G.W. (1997) Use of four DNA insertion sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium* complex isolated from animals. *Mol Cell Probes* **11**: 373-380.
- Collins, D.M., Gabric, D.M., y de Lisle, G.W. (1990) Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microbiol* **28**: 1591-1596.
- Collins, D.M., Kawakami, R.P., de Lisle, G.W., Pascopella, L., Bloom, B.R., y Jacobs, W.R., Jr. (1995) Mutation of the principal sigma factor causes loss of virulence in a strain of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8036-8040.
- Collins, D.M., De Zoete, M., y Cavaignac, S.M. (2002) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *J Clin Microbiol* **40**: 4760-4762.
- Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, and Board on Agriculture and Natural Resources. Diagnosis and control of Johne's disease (2003) Washington, D.C, The National Academies Press.
- Cooksey, R.C., de Waard, J.H., Yakus, M.A., Rivera, I., Chopite, M., Toney, S.R. y col. (2004) *Mycobacterium cosmeticum* sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from a cosmetic infection and from a nail salon. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2385-2391.
- Corn, J.L., Manning, E.J., Sreevatsan, S., y Fischer, J.R. (2005) Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6963-6967.
- Corpa, J.M., Garrido, J., García Marin, J.F., y Perez, V. (2000) Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J Comp Pathol* **122**: 255-265.

- Corti, S., y Stephan, R. (2002) Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiol* **2**: 15.
- Cousins, D.V., Williams, S.N., Hope, A., y Eamens, G.J. (2000) DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Aust Vet J* **78**: 184-190.
- Cousins, D.V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S. y col. (2003) Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1305-1314.
- Coussens, P.M., Colvin, C.J., Rosa, G.J., Perez, L.J., y Elftman, M.D. (2003) Evidence for a novel gene expression program in peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cattle. *Infect Immun* **71**: 6487-6498.
- Coussens, P.M., Colvin, C.J., Wiersma, K., Abouzied, A., y Sipkovsky, S. (2002) Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells from cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infect Immun* **70**: 5494-5502.
- Coussens, P.M., Pudrith, C.B., Skovgaard, K., Ren, X., Suchyta, S.P., Stabel, J.R., y Heegaard, P.M. (2005) Johne's disease in cattle is associated with enhanced expression of genes encoding IL-5, GATA-3, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2, and factors promoting apoptosis in peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* **105**: 221-234.
- Covert, T.C., Rodgers, M.R., Reyes, A.L., y Stelma, G.N., Jr. (1999) Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2492-2496.
- Crick, D.C., Mahapatra, S., y Brennan, P.J. (2001) Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* **11**: 107R-118R.
- Cuttino, J.T., y McCabe, A.M. (1949) Pure granulomatous nocardiosis, a new fungus disease distinguished by intracellular parasitism; a description of a new disease in man due to a hitherto undescribed organism, *Nocardia intracellularis*, n. sp., including a study of the biologic and pathogenic properties of this species. *Am J Pathol* **25**: 1-47.
- Da Costa Cruz, J.C. (1938) *Mycobacterium fortuitum* um novo bacillo acidoresistance patogenico para o homem. *Acta Medica* **1**: 297-301.
- Daffé, M., y Reyrat, J.M. (2008) The mycobacterial cell envelope. *American Society for Microbiology*.
- Damato, J.J., y Collins, M.T. (1990) Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media. *Vet Microbiol* **22**: 31-42.
- de Juan, L., Mateos, A., Domínguez, L., Sharp, J.M., y Stevenson, K. (2005) Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol* **106**: 249-257.
- de Juan, L., Álvarez, J., Aranaz, A., Rodríguez, A., Romero, B., Bezos, J. y col. (2006) Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. *Vet Microbiol* **115**: 102-110.
- de Lisle, G.W., Collins, D.M., y Huchzermeyer, H.F. (1992) Characterization of ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Onderstepoort J Vet Res* **59**: 163-165.
- de Lisle, G.W., Yates, G.F., y Collins, D.M. (1993) Paratuberculosis in farmed deer: case reports and DNA characterization of isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest* **5**: 567-571.
- Deka, R., De Croo, S., Yu, L.M., y Ferrell, R.E. (1992) Variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism at locus D17S5 (YNZ22) in four ethnically defined human populations. *Hum Genet* **90**: 86-90.

- Derz, K., Klinner, U., Schuphan, I., Stackebrandt, E., y Kroppenstedt, R.M. (2004) *Mycobacterium pyrenivorans* sp. nov., a novel polycyclic-aromatic-hydrocarbon-degrading species. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2313-2317.
- Dingle, K.E., Colles, F.M., Wareing, D.R., Ure, R., Fox, A.J., Bolton, F.E. y col. (2001) Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* **39**: 14-23.
- Djelouadji, Z., Raoult, D., Daffe, M., y Drancourt, M. (2008) A single-step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. *PLoS Negl Trop Dis* **2**: e253.
- Djonne, B., Jensen, M.R., Grant, I.R., y Holstad, G. (2003) Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet Microbiol* **92**: 135-143.
- Djonne, B., Pavlik, I., Svastova, P., Bartos, M., y Holstad, G. (2005) IS900 restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from goats and cattle in Norway. *Acta Vet Scand* **46**: 13-18.
- Dohmann, K., Strommenger, B., Stevenson, K., de Juan, L., Stratmann, J., Kapur, V. y col. (2003) Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates. *J Clin Microbiol* **41**: 5215-5223.
- Dolzani, L., Rosato, M., Sartori, B., Banfi, E., Lagatolla, C., Predominato, M. y col. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* isolates belonging to *katG gyrA* group 2 are associated with clustered cases of tuberculosis in Italian patients. *J Med Microbiol* **53**: 155-159.
- Domenech, P., Jimenez, M.S., Menendez, M.C., Bull, T.J., Samper, S., Manrique, A., y Garcia, M.J. (1997) *Mycobacterium mageritense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 535-540.
- Donaghy, J.A., Totton, N.L., y Rowe, M.T. (2004) Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4899-4905.
- Donat, K., Eulenberger, K., y Kampfer, P. (2005) Blutserologische Untersuchungen zur Verbreitung von *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in sächsischen Rinderbeständen. *Tieraerztliche Umschau* **60**: 497-501.
- Doran, T.J., Davies, J.K., Radford, A.J., y Hodgson, A.L. (1994) Putative functional domain within ORF2 on the *Mycobacterium* insertion sequences IS900 and IS902. *Immunol Cell Biol* **72**: 427-434.
- Dou, H.Y., Lu, J.J., Lin, C.W., Chang, J.R., Sun, J.R., y Su, I.J. (2009) Utility and evaluation of new variable-number tandem-repeat systems for genotyping mycobacterial tuberculosis isolates. *J Microbiol Methods* **77**: 127-129.
- Dreier, S., Khol, J.L., Stein, B., Fuchs, K., Gutler, S., y Baumgartner, W. (2006) Serological, bacteriological and molecularbiological survey of paratuberculosis (Johne's disease) in Austrian cattle. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**: 477-481.
- Drobniewski, F., Eltringham, I., Graham, C., Magee, J.G., Smith, E.G., y Watt, B. (2002) A national study of clinical and laboratory factors affecting the survival of patients with multiple drug resistant tuberculosis in the UK. *Thorax* **57**: 810-816.
- Eamens, G.J., Whittington, R.J., Turner, M.J., Austin, S.L., Fell, S.A., y Marsh, I.B. (2007) Evaluation of radiometric faecal culture and direct PCR on pooled faeces for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle. *Vet Microbiol* **125**: 22-35.
- Easterbrook, P.J., Gibson, A., Murad, S., Lamprecht, D., Ives, N., Ferguson, A. y col. (2004) High rates of clustering of strains causing tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol* **42**: 4536-4544.
- Eda, S., Bannantine, J.P., Waters, W.R., Mori, Y., Whitlock, R.H., Scott, M.C., y Speer, C.A. (2006) A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin Vaccine Immunol* **13**: 837-844.

- Ehrenreich, A. (2006) DNA microarray technology for the microbiologist: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**: 255-273.
- Ekbom, A., Helmick, C., Zack, M., y Adami, H.O. (1991) The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology* **100**: 350-358.
- El-Sayed, A., Hassan, A.A., Natour, S., Abdulmawjood, A., Bulte, M., Wolter, W., y Zschock, M. (2009) Evaluation of three molecular methods of repetitive element loci for differentiation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). *J Microbiol* **47**: 253-259.
- El-Shazly, S., Mustafa, A.S., Ahmad, S., y Al-Attayah, R. (2007) Utility of three mammalian cell entry proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in the serodiagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **11**: 676-682.
- Ellingson, J.L., Bolin, C.A., y Stabel, J.R. (1998) Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol Cell Probes* **12**: 133-142.
- Ellingson, J.L., Stabel, J.R., Bishai, W.R., Frothingham, R., y Miller, J.M. (2000) Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *Mol Cell Probes* **14**: 153-161.
- Ellingson, J.L., Koziczkowski, J.J., y Anderson, J.L. (2004) Comparison of PCR prescreening to two cultivation procedures with PCR confirmation for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in U.S. Department of Agriculture fecal check test samples. *J Food Prot* **67**: 2310-2314.
- Ellingson, J.L., Stabel, J.R., Radcliff, R.P., Whitlock, R.H., y Miller, J.M. (2005) Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in free-ranging bison (*Bison bison*) by PCR. *Mol Cell Probes* **19**: 219-225.
- Englund, S., Ballagi-Pordany, A., Bolske, G., y Johansson, K.E. (1999) Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **33**: 163-171.
- Englund, S., Bolske, G., Ballagi-Pordany, A., y Johansson, K.E. (2001) Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples by single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene. *Vet Microbiol* **81**: 257-271.
- Enosawa, M., Kageyama, S., Sawai, K., Watanabe, K., Notomi, T., Onoe, S. y col. (2003) Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* **41**: 4359-4365.
- Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., y Spratt, B.G. (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **38**: 1008-1015.
- Enright, M.C., Spratt, B.G., Kalia, A., Cross, J.H., y Bessen, D.E. (2001) Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between emm type and clone. *Infect Immun* **69**: 2416-2427.
- Erume, J., Spergser, J., y Rosengarten, R. (2001) Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. *Afr Health Sci* **1**: 83-89.
- Evans, J.T., Smith, E.G., Banerjee, A., Smith, R.M., Dale, J., Innes, J.A. y col. (2007) Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* **369**: 1270-1276.
- Fabre, M., Koeck, J.L., Le Fleche, P., Simon, F., Herve, V., Vergnaud, G., y Pourcel, C. (2004) High genetic diversity revealed by variable-number tandem repeat genotyping and analysis of *hsp65* gene polymorphism in a large collection of "*Mycobacterium canettii*" strains indicates that the *M. tuberculosis* complex is a recently emerged clone of "*M. canettii*". *J Clin Microbiol* **42**: 3248-3255.
- Fang, R., Li, X., Li, J., Wu, J., Shen, X., Gui, X. y col. (2008) Mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients in Shanghai, China. *Tuberculosis (Edinb)* **88**: 469-473.

- Fang, Y., Wu, W.H., Pepper, J.L., Larsen, J.L., Marras, S.A., Nelson, E.A. y col. (2002) Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples. *J Clin Microbiol* **40**: 287-291.
- Fanti, F., Tortoli, E., Hall, L., Roberts, G.D., Kroppenstedt, R.M., Dodi, I. y col. (2004) *Mycobacterium parmaense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1123-1127.
- Feil, E.J., Maiden, M.C., Achtman, M., y Spratt, B.G. (1999) The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol* **16**: 1496-1502.
- Feizabadi, M.M., Robertson, I.D., Cousins, D.V., Dawson, D., Chew, W., Gilbert, G.L., y Hampson, D.J. (1996) Genetic characterization of *Mycobacterium avium* isolates recovered from humans and animals in Australia. *Epidemiol Infect* **116**: 41-49.
- Feizabadi, M.M., Robertson, I.D., Edwards, R., Cousins, D.V., y Hampson, D.J. (1997) Genetic differentiation of Australian isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* **46**: 501-505.
- Feller, M., Huwiler, K., Stephan, R., Altpeter, E., Shang, A., Furrer, H. y col. (2007) *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **7**: 607-613.
- Ferweda, G., Kuliberg, D.J., y deJong, D.J. (2007) *Mycobacterium paratuberculosis* is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *J Leukoc Biol* **82**: 1011-1018.
- Filliol, I., Motiwala, A.S., Cavatore, M., Qi, W., Hazbon, M.H., Bobadilla del Valle, M y col. (2006) Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol* **188**: 759-772.
- Fischer, O., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Bartl, J., Melicharek, I. y col. (2001) Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. *Med Vet Entomol* **15**: 208-211.
- Fischer, O.A., Matlova, L., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., du Maine, R. y col. (2003) Earthworms (*Oligochaeta, Lumbricidae*) and mycobacteria. *Vet Microbiol* **91**: 325-338.
- Fischer, O.A., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., y Pavlik, I. (2003) Nymphs of the Oriental cockroach (*Blatta orientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. *Med Vet Entomol* **17**: 145-150.
- Fleischmann, R.D., Alland, D., Eisen, J.A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J. y col. (2002) Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* **184**: 5479-5490.
- Flesselles, B., Anand, N.N., Remani, J., Loosmore, S.M., y Klein, M.H. (1999) Disruption of the mycobacterial cell entry gene of *Mycobacterium bovis* BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* **177**: 237-242.
- Floyd, M.M., Guthertz, L.S., Silcox, V.A., Duffey, P.S., Jang, Y., Desmond, E.P. y col. (1996) Characterization of an SAV organism and proposal of *Mycobacterium triplex* sp. nov. *J Clin Microbiol* **34**: 2963-2967.
- Floyd, M.M., Gross, W.M., Bonato, D.A., Silcox, V.A., Smithwick, R.W., Metchock, B. y col. (2000) *Mycobacterium kubicae* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic *Mycobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 5**: 1811-1816.
- Frothingham, R., y Meeker-O'Connell, W.A. (1998) Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* **144 (Pt 5)**: 1189-1196.
- Frothingham, R., Strickland, P.L., Bretzel, G., Ramaswamy, S., Musser, J.M., y Williams, D.L. (1999) Phenotypic and genotypic characterization of *Mycobacterium africanum* isolates from West Africa. *J Clin Microbiol* **37**: 1921-1926.

Gabig, M., y Wegrzyn, G. (2001) An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis. *Acta Biochim Pol* **48**: 615-622.

García de Viedma, D., Alonso Rodríguez, N., Andres, S., Ruiz Serrano, M.J., y Bouza, E. (2005) Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. *J Clin Microbiol* **43**: 5660-5664.

García Pelayo, M.C., Uplekar, S., Keniry, A., Mendoza, L.P., Garnier, T., Nunez, G.J. y col. (2009) A comprehensive survey of single nucleotide polymorphisms (SNPs) across *Mycobacterium bovis* strains and *M. bovis* BCG vaccine strains refines the genealogy and defines a minimal set of SNPs that separate virulent *M. bovis* strains and *M. bovis* BCG strains. *Infect Immun* **77**: 2230-2238.

García-Moyano, A., Gonzalez-Toril, E., Aguilera, A., y Amils, R. (2007) Prokaryotic community composition and ecology of floating macroscopic filaments from an extreme acidic environment, Rio Tinto (SW, Spain). *Syst Appl Microbiol* **30**: 601-614.

Garrido, J.M., Cortabarria, N., Oguiza, J.A., Aduriz, G., y Juste, R.A. (2000) Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet Microbiol* **77**: 379-386.

Gascoyne-Binzi, D.M., Barlow, R.E., Frothingham, R., Robinson, G., Collyns, T.A., Gelletlie, R., y Hawkey, P.M. (2001) Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using variable number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol* **39**: 69-74.

Gasteiner, J., Wenzl, H., Fuchs, K., Jark, U., y Baumgartner, W. (1999) Serological cross-sectional study of paratuberculosis in cattle in Austria. *Zentralbl Veterinarmed B* **46**: 457-466.

Ghadiali, A.H., Strother, M., Naser, S.A., Manning, E.J., y Sreevatsan, S. (2004) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from Crohn's disease patients and animal species exhibit similar polymorphic locus patterns. *J Clin Microbiol* **42**: 5345-5348.

Gibson, A.L., Hewinson, G., Goodchild, T., Watt, B., Story, A., Inwald, J., y Drobniewski, F.A. (2004) Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* **42**: 431-434.

Gilmour, N.J., y Angus, K.W. (1974) Absence of immunogenicity of an oral vaccine against *Mycobacterium johnei* in sheep. *Res Vet Sci* **16**: 269-270.

Gioffre, A., Infante, E., Aguilar, D., Santangelo, M.P., Klepp, L., Amadio, A. y col. (2005) Mutation in mce operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Microbes Infect* **7**: 325-334.

Godfroid, J., Delcorps, C., Ireng, L.M., Walravens, K., Marche, S., y Gala, J.L. (2005) Definitive differentiation between single and mixed mycobacterial infections in red deer (*Cervus elaphus*) by a combination of duplex amplification of p34 and f57 sequences and *Hpy*188I enzymatic restriction of duplex amplicons. *J Clin Microbiol* **43**: 4640-4648.

Godreuil, S., Torrea, G., Terru, D., Chevenet, F., Diagbouga, S., Supply, P. y col. (2007) First molecular epidemiology study of *Mycobacterium tuberculosis* in Burkina Faso. *J Clin Microbiol* **45**: 921-927.

Godreuil, S., Renaud, F., Choisy, M., Depina, J., Garnotel, E., Morillon, M. y col. (2009) Highly structured genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* population in Djibouti. *Clin Microbiol Infect*. In press.

Goh, K.S., Fabre, M., Huard, R.C., Schmid, S., Sola, C., y Rastogi, N. (2006) Study of the *gyrB* gene polymorphism as a tool to differentiate among *Mycobacterium tuberculosis* complex subspecies further underlines the older evolutionary age of *Mycobacterium canettii*. *Mol Cell Probes* **20**: 182-190.

Goh, K.S., Rastogi, N., Berchel, M., Huard, R.C., y Sola, C. (2005) Molecular evolutionary history of tubercle bacilli assessed by study of the polymorphic nucleotide within the nitrate reductase (*narGHJI*) operon promoter. *J Clin Microbiol* **43**: 4010-4014.

- Gomila, M., Ramirez, A., Gasco, J., y Lalucat, J. (2008) *Mycobacterium llatzerense* sp. nov., a facultatively autotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from haemodialysis water. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 2769-2773.
- González, J., Geijo, M.V., García-Pariente, C., Verna, A., Corpa, J.M., Reyes, L.E. y col. (2005) Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J Comp Pathol* **133**: 184-196.
- Gordon, S.V., Heym, B., Parkhill, J., Barrell, B., y Cole, S.T. (1999) New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* **145** (Pt 4): 881-892.
- Goren, M.B., y Brenna, P.J. (1979) Mycobacterial lipids: Chemistry and biologic activities in tuberculosis. *W. B. Saunders Company*. In press.
- Grant, I.R., O'Riordan, L.M., Ball, H.J., y Rowe, M.T. (2001) Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw sheep and goats' milk in England, Wales and Northern Ireland. *Vet Microbiol* **79**: 123-131.
- Green, E.P., Tizard, M.L., Moss, M.T., Thompson, J., Winterbourne, D.J., McFadden, J.J., y Hermon-Taylor, J. (1989) Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res* **17**: 9063-9073.
- Greig, A., Stevenson, K., Perez, V., Pirie, A.A., Grant, J.M., y Sharp, J.M. (1997) Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Rec* **140**: 141-143.
- Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I. y col. (1999) Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J Clin Microbiol* **37**: 1746-1751.
- Griffin, J.F., Spittle, E., Rodgers, C.R., Liggett, S., Cooper, M., Bakker, D., y Bannantine, J.P. (2005) Immunoglobulin G1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's Disease in red deer (*Cervus elaphus*). *Clin Diagn Lab Immunol* **12**: 1401-1409.
- Griffin, J.F., Hughes, A.D., Liggett, S., Farquhar, P.A., Mackintosh, C.G., y Bakker, D. (2009) Efficacy of novel lipid-formulated whole bacterial cell vaccines against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. *Vaccine* **27**: 911-918.
- Griffiths, D., Fawley, W., Kachrimanidou, M., Bowden, R., Crook, D.W., Fung, R. y col. (2010) Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* **48**: 770-8.
- Griffiths, T.A., Rioux, K., y De Buck, J. (2008) Sequence polymorphisms in a surface PPE protein distinguish types I, II, and III of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* **46**: 1207-1212.
- Groathouse, N.A., Rivoire, B., Kim, H., Lee, H., Cho, S.N., Brennan, P.J., y Vissa, V.D. (2004) Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol* **42**: 1666-1672.
- Gunnarsson, E., y Fodstad, F.H. (1979) Cultural and biochemical characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from goats in Norway. *Acta Vet Scand* **20**: 122-134.
- Gutierrez, M.C., Ahmed, N., Willery, E., Narayanan, S., Hasnain, S.E., Chauhan, D.S. y col. (2006) Predominance of ancestral lineages of *Mycobacterium tuberculosis* in India. *Emerg Infect Dis* **12**: 1367-1374.
- Gwozdz, J.M., Reichel, M.P., Murray, A., Manktelow, W., West, D.M., y Thompson, K.G. (1997) Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* **57**: 233-244.
- Gwozdz, J.M., Thompson, K.G., Manktelow, B.W., Murray, A., y West, D.M. (2000) Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Aust Vet J* **78**: 560-566.

- Gwozdz, J.M., Thompson, K.G., Murray, A., Reichel, M.P., Manktelow, B.W., y West, D.M. (2000) Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust Vet J* **78**: 779-783.
- Gwozdz, J.M., Thompson, K.G., Murray, A., West, D.M., y Manktelow, B.W. (2000) Use of the polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in blood and liver biopsies from experimentally infected sheep. *Aust Vet J* **78**: 622-624.
- Haas, W.H., Butler, W.R., Kirschner, P., Plikaytis, B.B., Coyle, M.B., Amthor, B. y col. (1997) A new agent of mycobacterial lymphadenitis in children: *Mycobacterium heidelbergense* sp. nov. *J Clin Microbiol* **35**: 3203-3209.
- Hagglblom, M.M., Nohynek, L.J., Palleroni, N.J., Kronqvist, K., Nurmiäho-Lassila, E.L., Salkinoja-Salonen, M.S. y col. (1994) Transfer of polychlorophenol-degrading *Rhodococcus chlorophenolicus* (Apajalahti y col. 1986) to the genus *Mycobacterium* as *Mycobacterium chlorophenolicum* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 485-493.
- Haile, Y., Caugant, D.A., Bjune, G., y Wiker, H.G. (2002) *Mycobacterium tuberculosis* mammalian cell entry operon (mce) homologs in *Mycobacterium* other than tuberculosis (MOTT). *FEMS Immunol Med Microbiol* **33**: 125-132.
- Hanekom, M., van der Spuy, G.D., Gey van Pittius, N.C., McEvoy, C.R., Hoek, K.G., Ndabambi, S.L. y col. (2008) Discordance between mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing and IS6110 restriction fragment length polymorphism genotyping for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in a setting of high incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* **46**: 3338-3345.
- Harris, N.B., y Barletta, R.G. (2001) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev* **14**: 489-512.
- Hatfull, G.F., y Jacobs Jr., W.R. (2000) Molecular genetics of mycobacteria. *American Society for Microbiology*. In press.
- Hauduroy, P. (1955) A new group of mycobacteria: the abnormal mycobacteria. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **89**: 673-675.
- Havelaar, A.H., Berwald, L.G., Groothuis, D.G., y Baas, J.G. (1985) Mycobacteria in semi-public swimming-pools and whirlpools. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B* **180**: 505-514.
- Hebert, A.M., Talarico, S., Yang, D., Durmaz, R., Marrs, C.F., Zhang, L. y col. (2007) DNA polymorphisms in the *pepA* and *PPE18* genes among clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for vaccine efficacy. *Infect Immun* **75**: 5798-5805.
- Hennessee, C.T., Seo, J.S., Álvarez, A.M., y Li, Q.X. (2009) Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading species isolated from Hawaiian soils: *Mycobacterium crocinum* sp. nov., *Mycobacterium pallens* sp. nov., *Mycobacterium rutilum* sp. nov., *Mycobacterium rufum* sp. nov. and *Mycobacterium aromaticivorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 378-387.
- Hermon-Taylor, J., y El-Zaatari, F.A.K. (2004) Pathogenic mycobacteria in water. *World Health Organization (WHO)* 74-93.
- Herthnek, D., y Bolske, G. (2006) New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *BMC Microbiol* **6**: 87.
- Hett, E.C., y Rubin, E.J. (2008) Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 126-56.
- Higgins, C.F., McLaren, R.S., y Newbury, S.F. (1988) Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion? A review. *Gene* **72**: 3-14.
- Hilbink, F., y West, D. (1990) The antibody response of sheep to vaccination against Johne's disease. *N Z Vet J* **38**: 168-169.

- Hilty, M., Diguimbaye, C., Schelling, E., Baggi, F., Tanner, M., y Zinsstag, J. (2005) Evaluation of the discriminatory power of variable number tandem repeat (VNTR) typing of *Mycobacterium bovis* strains. *Vet Microbiol* **109**: 217-222.
- Hilty, M., Yeboah-Manu, D., Boakye, D., Mensah-Quainoo, E., Rondini, S., Schelling, E. y col. (2006) Genetic diversity in *Mycobacterium ulcerans* isolates from Ghana revealed by a newly identified locus containing a variable number of tandem repeats. *J Bacteriol* **188**: 1462-1465.
- Hoek, K.G., Gey van Pittius, N.C., Moolman-Smook, H., Carelse-Tofa, K., Jordaan, A., van der Spuy, G.D. y col. (2008) Fluorometric assay for testing rifampin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* **46**: 1369-1373.
- Homolka, S., Post, E., Oberhauser, B., George, A.G., Westman, L., Dafaie, F. y col. (2008) High genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from Sierra Leone. *BMC Microbiol* **8**: 103.
- Hope, A.F., Kluver, P.F., Jones, S.L., y Condrón, R.J. (2000) Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust Vet J* **78**: 850-856.
- Hormish, D., Brost, I., Kohring, G.W., Giffhorn, F., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E. y col. (2004) *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B₁ degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *Syst. Appl. Microbiol* **27**: 653-660.
- Horsburgh, C.R., Jr., Havlik, J.A., Ellis, D.A., Kennedy, E., Fann, S.A., Dubois, R.E., y Thompson, S.E. (1991) Survival of patients with acquired immune deficiency syndrome and disseminated *Mycobacterium avium* complex infection with and without antimycobacterial chemotherapy. *Am Rev Respir Dis* **144**: 557-559.
- Huard, R.C., Fabre, M., de Haas, P., Lazzarini, L.C., van Soolingen, D., Cousins, D., y Ho, J.L. (2006) Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Bacteriol* **188**: 4271-4287.
- Hughes, A.L., Friedman, R., y Murray, M. (2002) Genomewide pattern of synonymous nucleotide substitution in two complete genomes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis* **8**: 1342-1346.
- Hultén, K., Karttunen, T.J., El-Zimaity, H.M., Naser, S.A., Almashhrawi, A., Graham, D.Y., y el-Zaatari, F.A. (2000) In situ hybridization method for studies of cell wall deficient *M. paratuberculosis* in tissue samples. *Vet Microbiol* **77**: 513-518.
- Hunt, D.M., Saldanha, J.W., Brennan, J.F., Benjamin, P., Strom, M., Cole, J.A. y col. (2008) Single nucleotide polymorphisms that cause structural changes in the cyclic AMP receptor protein transcriptional regulator of the tuberculosis vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG alter global gene expression without attenuating growth. *Infect Immun* **76**: 2227-2234.
- Ikiz, S., Bağcigil, A.F., Ak, S., Özgür, N.Y., y Iğaz, A. (2005) Paratuberculosis in cattle in Turkey detected by PCR. *Medycyna Weterynaryjna* **61**: 881-883.
- Ikonomopoulos, J., Gazouli, M., Pavlik, I., Bartos, M., Zacharatos, P., Xylouri, E. y col. (2004) Comparative evaluation of PCR assays for the robust molecular detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Microbiol Methods* **56**: 315-321.
- Inagaki, T., Nishimori, K., Yagi, T., Ichikawa, K., Moriyama, M., Nakagawa, T. y col. (2009) Comparison of a variable-number tandem-repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with mycobacterial interspersed repetitive-unit-VNTR and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol* **47**: 2156-2164.
- Inderlied, C.B., Kemper, C.A., y Bermudez, L.E. (1993) The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev* **6**: 266-310.

- Irenge, L.M., Walravens, K., Govaerts, M., Godfroid, J., Rosseels, V., Huygen, K., y Gala, J.L. (2009) Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* sub sp. *paratuberculosis* in faecal samples. *Vet Microbiol* **136**: 166-172.
- Iwamoto, T., Yoshida, S., Suzuki, K., Tomita, M., Fujiyama, R., Tanaka, N. y col. (2007) Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. *FEMS Microbiol Lett* **270**: 67-74.
- Jaluria, P., Konstantopoulos, K., Betenbaugh, M., y Shiloach, J. (2007) A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses. *Microb Cell Fact* **6**: 4.
- Jaravata, C.V., Smith, W.L., Rensen, G.J., Ruzante, J., y Cullor, J.S. (2007) Survey of ground beef for the detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Foodborne Pathog Dis* **4**: 103-106.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., y Thein, S.L. (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* **314**: 67-73.
- Jeon, B., Je, S., Park, J., Kim, Y., Lee, E.G., Lee, H. y col. (2008) Variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Gyeonggi-do, Korea. *J Vet Sci* **9**: 145-153.
- Jeyanathan, M., Boutros-Tadros, O., Radhi, J., Semret, M., Bitton, A., y Behr, M.A. (2007) Visualization of *Mycobacterium avium* in Crohn's tissue by oil-immersion microscopy. *Microbes Infect* **9**: 1567-1573.
- Jiao, W.W., Mokrousov, I., Sun, G.Z., Guo, Y.J., Vyazovaya, A., Narvskaya, O., y Shen, A.D. (2008) Evaluation of new variable-number tandem-repeat systems for typing *Mycobacterium tuberculosis* with Beijing genotype isolates from Beijing, China. *J Clin Microbiol* **46**: 1045-1049.
- Jimenez, M.S., Campos-Herrero, M.I., García, D., Luquin, M., Herrera, L., y García, M.J. (2004) *Mycobacterium canariense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1729-1734.
- Johansen, T.B., Djonne, B., Jensen, M.R., y Olsen, I. (2005) Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited. *J Clin Microbiol* **43**: 2500-2502.
- Johansen, T.B., Olsen, I., Jensen, M.R., Dahle, U.R., Holstad, G., y Djonne, B. (2007) New probes used for IS1245 and IS1311 restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates of human and animal origin in Norway. *BMC Microbiol* **7**: 14.
- Johnson-Ifearefulundu, Y.J., Kaneene, J.B., Sprecher, D.J., Gardiner, J.C., y Lloyd, J.W. (2000) The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Prev Vet Med* **46**: 171-181.
- Jones, P.H., Farver, T.B., Beaman, B., Cetinkaya, B., y Morgan, K.L. (2006) Crohn's disease in people exposed to clinical cases of bovine paratuberculosis. *Epidemiol Infect* **134**: 49-56.
- Jorgensen, J.B. (1977) Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord Vet Med* **29**: 267-270.
- Jubb, T.F., Sergeant, E.S., Callinan, A.P., y Galvin, J. (2004) Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect John's disease in Victorian dairy cattle herds. *Aust Vet J* **82**: 569-573.
- Juste, R.A., García Marin, J.F., Peris, B., Saez de Ocariz, C.S., y Badiola, J.J. (1994) Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Comp Pathol* **110**: 185-194.
- Juste, R.A., Garrido, J.M., Geijo, M., Elguezal, N., Aduriz, G., Atxaerandio, R., y Sevilla, I. (2005) Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. *J Vet Diagn Invest* **17**: 354-359.
- Kalis, C.H., Collins, M.T., Hesselink, J.W., y Barkema, H.W. (2003) Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet Microbiol* **97**: 73-86.

- Kam, K.M., Yip, C.W., Tse, L.W., Leung, K.L., Wong, K.L., Ko, W.M., y Wong, W.S. (2006) Optimization of variable number tandem repeat typing set for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Beijing family. *FEMS Microbiol Lett* **256**: 258-265.
- Karassova, V., Weissfeiler, J., y Krasznay, E. (1965) Occurrence of atypical mycobacteria in *Macacus rhesus*. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* **12**: 275-282.
- Karlson, A.G., y Lessel, E.F. (1970) *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Int. J. of Syst.Bacteriol.* **20**: 273-282.
- Kaser, M., Hauser, J., y Pluschke, G. (2009) Single nucleotide polymorphisms on the road to strain differentiation in *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol* **47**: 3647-3652.
- Kaur, P., Folia, G., Singh, S.V., Patil, P.K., y Sandhu, K.S. (2010) Molecular detection and typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from milk samples of dairy animals. *Trop Anim Health Prod.* En prensa.
- Kawaji, S., Taylor, D.L., Mori, Y., y Whittington, R.J. (2007) Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Vet Microbiol* **125**: 36-48.
- Kazda, J. (1980) *Mycobacterium sphagni* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **30**: 77-81.
- Kazda, J., y Müller, K. (1979) *Mycobacterium komossense* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **29**: 361-365.
- Kazda, J., Stackebrandt, E., Smida, J., Minnikin, D.E., Daffe, M., Parlett, J.H., y Pitulle, C. (1990) *Mycobacterium cookii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **40**: 217-223.
- Kazda, J., Müller, H.J., Stackebrandt, E., Daffe, M., Müller, K., y Pitulle, C. (1992) *Mycobacterium madagascariense* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **42**: 524-528.
- Kazda, J., Cooney, R., Monaghan, M., Quinn, P.J., Stackebrandt, E., Dorsch, M. y col. (1993) *Mycobacterium hiberniae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 352-357.
- Kazumi, Y., Udagawa, T., Maeda, S., Murase, Y., Sugawara, I., Okumura, M. y col. (2007) Comparison of usefulness between variable numbers of tandem repeats (VNTR) analysis and restriction fragment length polymorphism (RFLP) in the genotyping of *Mycobacterium avium*. *Kekkaku* **82**: 741-748.
- Keim, P., Price, L.B., Klevytska, A.M., Smith, K.L., Schupp, J.M., Okinaka, R. y col. (2000) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **182**: 2928-2936.
- Kennedy, D.J., y Benedictus, G. (2001) Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev Sci Tech* **20**: 151-179.
- Khan, A.A., Kim, S.J., Paine, D.D., y Cerniglia, C.E. (2002) Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Mycobacterium* sp. strain PYR-1, as *Mycobacterium vanbaalenii* sp. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **52**: 1997-2002.
- Kiehnbau, L.A., Amons, A., Wells, S.J., y Kapur, V. (2005) Amplified fragment length polymorphism to detect clonal diversity and distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in selected Minnesota dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* **17**: 311-315.
- Kikuchi, T., Watanabe, A., Gomi, K., Sakakibara, T., Nishimori, K., Daito, H. y col. (2009) Association between mycobacterial genotypes and disease progression in *Mycobacterium avium* pulmonary infection. *Thorax* **64**: 901-907.
- Kimura, M., Sakamuri, R.M., Groathouse, N.A., Rivoire, B.L., Gingrich, D., Krueger-Koplin, S. y col. (2009) Rapid variable-number tandem-repeat genotyping for *Mycobacterium leprae* clinical specimens. *J Clin Microbiol* **47**: 1757-1766.

- Kirschner, P., y Bottger, E.C. (1992) Headaches for taxonomists: the *M. avium*-*M. intracellulare* complex. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 335-336.
- Kirschner, P., Teske, A., Schroder, K.H., Kroppenstedt, R.M., Wolters, J., y Bottger, E.C. (1992) *Mycobacterium confluentis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 257-262.
- Kleespies, M., Kroppenstedt, R.M., Rainey, F.A., Webb, L.E., y Stackebrandt, E. (1996) *Mycobacterium hodleri* sp. nov., a new member of the fast-growing mycobacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 683-687.
- Kluge, J.P., Merkal, R.S., Monlux, W.S., Larsen, A.B., Kopecky, K.E., Ramsey, F.K., y Lehmann, R.P. (1968) Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation lesions and demonstration of etiologic agent. *Am J Vet Res* **29**: 953-962.
- Kohler, H., Gyra, H., Zimmer, K., Drager, K.G., Burkert, B., Lemser, B. y col. (2001) Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **48**: 185-195.
- Kojima, N., Araki, Y., e Ito, E. (1985) Structure of the linkage units between ribitol teichoic acids and peptidoglycan. *J Bacteriol* **161**: 299-306.
- Komijn, R.E., de Haas, P.E., Schneider, M.M., Eger, T., Nieuwenhuijs, J.H., van den Hoek, R.J. y col. (1999) Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in The Netherlands and comparison of IS1245 restriction fragment length polymorphism patterns of porcine and human isolates. *J Clin Microbiol* **37**: 1254-1259.
- Kopecná, M., Ondrus, S., Literák, I., Klimes, J., Horvathová, A., Moravková, M. y col. (2006) Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in two brown bears in the central European Carpathians. *J Wildl Dis* **42**: 691-695.
- Koukila-Kahkola, P., Springer, B., Bottger, E.C., Paulin, L., Jantzen, E., y Katila, M.L. (1995) *Mycobacterium branderi* sp. nov., a new potential human pathogen. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 549-553.
- Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W.H., Hermans, P.W., Martin, C. y col. (1999) Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* **37**: 2607-2618.
- Kremer, K., Au, B.K., Yip, P.C., Skuce, R., Supply, P., Kam, K.M., y van Soolingen, D. (2005) Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *J Clin Microbiol* **43**: 314-320.
- Kubica, G.P., Silcox, V.A., Kilburn, J.O., Smithwick, R.W., Beam, R.E., Jones Jr, W.D., y Stottmeier, K.D. (1970) Differential identification of mycobacteria. VI. *Mycobacterium triviale* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol* **20**: 161-174.
- Kudahl, A.B., y Nielsen, S.S. (2009) Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *J Dairy Sci* **92**: 4340-4346.
- Kumar, S., Singh, S.V., Singh, A.V., Singh, P.K., Sohal, J.S., y Maitra, A. (2008) Wildlife (*Boselaphus tragocamelus*)-small ruminant (goat and sheep) interface in the transmission of 'Bison type' genotype of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in India. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **33**: 155-159.
- Kurade, N.P., Tripathi, B.N., Rajukumar, K., y Parihar, N.S. (2004) Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol* **41**: 378-387.
- Kusunoki, S., y Ezaki, T. (1992) Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 240-245.

- Lamy, B., Marchandin, H., Hamitouche, K., y Laurent, F. (2008) *Mycobacterium setense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum*-group organism isolated from a patient with soft tissue infection and osteitis. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 486-490.
- Lari, N., Rindi, L., Bonanni, D., Tortoli, E., y Garzelli, C. (2006) Molecular analysis of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* recovered from humans in Italy. *J Clin Microbiol* **44**: 4218-4221.
- Larsen, A.B., y Vardaman, T.H. (1953) The effect of isonicotinic acid hydrazide on *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Am Vet Med Assoc* **122**: 309-310.
- Larsen, A.B., Merkal, R.S., y Vardaman, T.H. (1956) Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* **17**: 549-551.
- Larsen, A.B., Moon, H.W., y Merkal, R.S. (1971) Susceptibility of swine to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* **32**: 589-595.
- Larsen, A.B., Merkal, R.S., y Cutlip, R.C. (1975) Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* **36**: 255-257.
- Larsen, A.B., y Miller, J.M. (1978) Mammary gland exposure of cows to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* **39**: 1972-1974.
- Lavender, C.J., Stinear, T.P., Johnson, P.D., Azuolas, J., Benbow, M.E., Wallace, J.R., y Fyfe, J.A. (2008) Evaluation of VNTR typing for the identification of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples from Victoria, Australia. *FEMS Microbiol Lett* **287**: 250-255.
- Lazzarini, L.C., Huard, R.C., Boechat, N.L., Gomes, H.M., Oelemann, M.C., Kurepina, N. y col. (2007) Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* **45**: 3891-3902.
- Le Fleche, P., Fabre, M., Denoeud, F., Koeck, J.L., y Vergnaud, G. (2002) High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol* **2**: 37.
- Lehmann, K.B., y Neumann, R. (1896) Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. 1st. ed.
- Lehmann, K.B., y Neumann, R. (1899) Lehmann's Medizin, Handatlanter X. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. 2 Aulf. 1-497.
- Leoni, E., Legnani, P., Mucci, M.T., y Pirani, R. (1999) Prevalence of mycobacteria in a swimming pool environment. *J Appl Microbiol* **87**: 683-688.
- Levi, M.H., Bartell, J., Gandolfo, L., Smole, S.C., Costa, S.F., Weiss, L.M. y col. (2003) Characterization of *Mycobacterium montefiorensis* sp. nov., a novel pathogenic *Mycobacterium* from moray eels that is related to *Mycobacterium triplex*. *J Clin Microbiol* **41**: 2147-2152.
- Levinson, G., y Gutman, G.A. (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* **4**: 203-221.
- Lévy-Frébault, V., Rafidinarivo, E., Prome, J.C., Grandry, J., Boisvert, H., y David, H.L. (1983) *Mycobacterium fallax* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol* **33**: 336-346.
- Levy-Frebault, V.V., y Portaels, F. (1992) Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 315-323.
- Leys, N.M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Wattiau, P., Top, E.M., Verstraete, W., y Springael, D. (2005) Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Ecol* **51**: 375-388.

- Li, L., Bannantine, J.P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B.J., Alt, D. y col. (2005) The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 12344-12349.
- Li, Y., Miltner, E., Wu, M., Petrofsky, M., y Bermudez, L.E. (2005) A *Mycobacterium avium* PPE gene is associated with the ability of the bacterium to grow in macrophages and virulence in mice. *Cell Microbiol* **7**: 539-548.
- Lillini, E., Bitoni, G., Gamberale, F., y Cersini, A. (2005) Prevalence of bovine paratuberculosis in the Latium region (Italy). Libro de resúmenes del 8º Coloquio Internacional de Paratuberculosis. 638-644.
- Lindstedt, B.A. (2005) Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* **26**: 2567-2582.
- Lipshutz, R.J., Fodor, S.P., Gingeras, T.R., y Lockhart, D.J. (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* **21**: 20-24.
- Lisitsyn, N.A., Rosenberg, M.V., Launer, G.A., Wagner, L.L., Potapov, V.K., Kolesnik, T.B., y Sverdlov, E.D. (1993) A method for isolation of sequences missing in one of two related genomes. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* **3**: 26-29.
- Liu, J., Wang, Z., Wen, Y., Tian, X.J., Chen, X.H., Li, H.Y., y Weng, X.M. (2007) Study on genotyping of *Mycobacterium leprae* and families with multi-cases. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* **28**: 649-655.
- Lloyd, J.B., Whittington, R.J., Fitzgibbon, C., y Dobson, R. (2001) Presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in suspensions of ovine trichostrongylid larvae produced in faecal cultures artificially contaminated with the bacterium. *Vet Rec* **148**: 261-263.
- Lu, B., Li, Z.N., Liu, M., Liu, Z.G., Zhao, X.Q., y Wan, K.L. (2009) Discrimination power evaluation for 45 loci of variable number tandem repeats in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* **30**: 58-62.
- Luquin, M., Ausina, V., Vincent-Lévy-Frébault, V., Lanéelle, M.A., Belda, F., García-Barceló, M. y col. (1993) *Mycobacterium brumae* sp. nov., a rapidly growing, nonphotochromogenic mycobacterium. *Int.J.Syst.Bacteriol* **43**: 405-413.
- MacCallum, P., Tolhurst, J.C., y Buckle, G. (1950) The significance of the incubation period in infectious diseases. *Medical Journal of Australia* **2**: 813-818.
- Machackova, M., Svastova, P., Lamka, J., Parmova, I., Liska, V., Smolik, J. y col. (2004) Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001). *Vet Microbiol* **101**: 225-234.
- Machackova-Kopečna, M., Bartos, M., Straka, M., Ludvik, V., Svastova, P., Álvarez, J. y col. (2005) Paratuberculosis and avian tuberculosis infections in one red deer farm studied by IS900 and IS901 RFLP analysis. *Vet Microbiol* **105**: 261-268.
- Mackenzie, N., Alexander, D.A., Turenne, C.Y., Behr, M.A., y De Buck, J.M. (2009) Genomic comparison of the PE and PPE genes in the *Mycobacterium avium* complex. *J Clin Microbiol* **47**: 1002-1011.
- Mackintosh, C.G., Labes, R.E., y Griffin, J.F. (2005) The effect of Johne's vaccination on tuberculin testing in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *N Z Vet J* **53**: 216-222.
- Maeda, S., Murase, Y., Mitarai, S., Sugawara, I., y Kato, S. (2008) Rapid, simple genotyping method by the variable numbers of tandem repeats (VNTR) for *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Japan--analytical procedure of JATA (12)-VNTR. *Kekkaku* **83**: 673-678.
- Maes, M., Kremer, K., van Soolingen, D., Takiff, H., y de Waard, J.H. (2008) 24-locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. *Tuberculosis (Edinb)* **88**: 490-494.
- Magdalena, J., Supply, P., y Loch, C. (1998) Specific differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* **36**: 2471-2476.

- Mahillon, J., y Chandler, M. (1998) Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 725-774.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R. y col. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3140-3145.
- Manning, E.J., y Collins, M.T. (2001) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev Sci Tech* **20**: 133-150.
- Marchoux, F., y Sorel, E. (1912) Recherches sur la lèpre. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)* **26**: 675-700.
- Marks, J., Jenkins, P.A., y Tsukamura, M. (1972) *Mycobacterium szulgai*--a new pathogen. *Tubercle* **53**: 210-214.
- Marme, N., Friedrich, A., Muller, M., Nolte, O., Wolfrum, J., Hoheisel, J.D. y col. (2006) Identification of single-point mutations in mycobacterial 16S rRNA sequences by confocal single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nucleic Acids Res* **34**: e90.
- Marri, P.R., Bannantine, J.P., y Golding, G.B. (2006) Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 906-925.
- Marsh, I., Whittington, R., y Cousins, D. (1999) PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Mol Cell Probes* **13**: 115-126.
- Marsh, I.B., y Whittington, R.J. (2001) Progress towards a rapid polymerase chain reaction diagnostic test for the identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces. *Mol Cell Probes* **15**: 105-118.
- Marsh, I.B., y Whittington, R.J. (2005) Deletion of an *mmpL* gene and multiple associated genes from the genome of the S strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* identified by representational difference analysis and in silico analysis. *Mol Cell Probes* **19**: 371-384.
- Marsh, I.B., Bannantine, J.P., Paustian, M.L., Tizard, M.L., Kapur, V., y Whittington, R.J. (2006) Genomic comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sheep and cattle strains by microarray hybridization. *J Bacteriol* **188**: 2290-2293.
- Marsh, I.B., y Whittington, R.J. (2006) Genomic diversity in *Mycobacterium avium*: Single nucleotide polymorphisms between the S and C strains of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and with *M. a. avium*. *Mol Cell Probes* **21**: 66-75.
- Martín, A., Herranz, M., Serrano, M.J., Bouza, E., y García de Vezma, D. (2007) Rapid clonal analysis of recurrent tuberculosis by direct MIRU-VNTR typing on stored isolates. *BMC Microbiol* **7**: 73.
- Martínez, L.R., Harris, B., Black, W.C., Meyer, R.M., Brennan, P.J., Vissa, V.D., y Jones, R.L. (2008) Genotyping North American animal *Mycobacterium bovis* isolates using multilocus variable number tandem repeat analysis. *J Vet Diagn Invest* **20**: 707-715.
- Masaki, T., Ohkusu, K., Hata, H., Fujiwara, N., Iihara, H., Yamada-Noda, M. y col. (2006) *Mycobacterium kumamotonense* Sp. Nov. recovered from clinical specimen and the first isolation report of *Mycobacterium arupense* in Japan: Novel slowly growing, nonchromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium terrae* complex. *Microbiol Immunol* **50**: 889-897.
- Masson, A.M., y Prissick, F.H. (1956) Cervical lymphadenitis in children caused by chromogenic Mycobacteria. *Can Med Assoc J* **75**: 798-803.
- Matsuoka, M. (2009) Recent advances in the molecular epidemiology of leprosy. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi* **78**: 67-73.
- Matthews, P.R., y McDiarmid, A. (1979) The production in bovine calves of a disease resembling paratuberculosis with a *Mycobacterium* sp isolated from a woodpigeon (*Columba palumbus* L.). *Vet Rec* **104**: 286.

- Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A.L., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B. y col. (2001) High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 1901-1906.
- McCammon, M.T., Gillette, J.S., Thomas, D.P., Ramaswamy, S.V., Graviss, E.A., Kreiswirth, B.N. y col. (2005) Detection of *rpoB* mutations associated with rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using denaturing gradient gel electrophoresis. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2200-2209.
- McCammon, M.T., Gillette, J.S., Thomas, D.P., Ramaswamy, S.V., Rosas, I.I., Graviss, E.A. y col. (2005) Detection by denaturing gradient gel electrophoresis of *pncA* mutations associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the United States-Mexico border region. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2210-2217.
- McClure, H.M., Chiodini, R.J., Anderson, D.C., Swenson, R.B., Thayer, W.R., y Coutu, J.A. (1987) *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). *J Infect Dis* **155**: 1011-1019.
- McFadden, J.J., Butcher, P.D., Thompson, J., Chiodini, R., y Hermon-Taylor, J. (1987) The use of DNA probes identifying restriction-fragment-length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. *Mol Microbiol* **1**: 283-291.
- McNeil, M., Daffe, M., y Brennan, P.J. (1990) Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *J Biol Chem* **265**: 18200-18206.
- Meier, A., Kirschner, P., Schroder, K.H., Wolters, J., Kroppenstedt, R.M., y Bottger, E.C. (1993) *Mycobacterium intermedium* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 204-209.
- Meisal, R., Andreasson, I.K., Høiby, E.A., Aaberge, I.S., Michaelsen, T.E., y Caugant, D.A. (2010) *Streptococcus pyogenes* isolates causing severe infections in Norway in 2006 to 2007: emm types, multilocus sequence types, and superantigen profiles. *J Clin Microbiol* **48**: 842-51.
- Mendes, S., Boinas, F., Albuquerque, T., Fernandes, L., Alfonso, A., y Amado, A. (2004) Epidemiological studies on paratuberculosis in small ruminants in Portugal. *Epidemiol.Sante Anim* **45**: 61-71.
- Menéndez, M.C., Buxton, R.S., Evans, J.T., Gascoyne-Binzi, D., Barlow, R.E., Hinds, J. y col. (2007) Genome analysis shows a common evolutionary origin for the dominant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a UK South Asian community. *Tuberculosis (Edinb)* **87**: 426-436.
- Merkal, R.S., y Larsen, A.B. (1973) Clofazimine treatment of cows naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* **34**: 27-28.
- Merkal, R.S., y Curran, B.J. (1974) Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Microbiol* **28**: 276-279.
- Merkal, R.S., Miller, J.M., Hintz, A.M., y Bryner, J.H. (1982) Intrauterine inoculation of *Mycobacterium paratuberculosis* into guinea pigs and cattle. *Am J Vet Res* **43**: 676-678.
- Merkal, R.S. (1984) Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods. *J Am Vet Med Assoc* **184**: 939-943.
- Meylan, M., Nicolet, J., Busato, A., Burnens, A., y Martig, J. (1995) Etude de prevalence de la paratuberculose dans la region du Plateau de Diesse. *Schweiz.Arch.Tierheilkd* **137**: 22-25.
- Michel, A.L., Hlokwé, T.M., Coetzee, M.L., Mare, L., Connaway, L., Rutten, V.P., y Kremer, K. (2008) High *Mycobacterium bovis* genetic diversity in a low prevalence setting. *Vet Microbiol* **126**: 151-159.
- Millán, J., Negré, N., Castellanos, E., de Juan, L., Mateos, A., Parpal, L., y Aranaz, A. (2010) Avian mycobacteriosis in free-living raptors in Majorca Island, Spain. *Avian Pathology* **39**: 1-6.
- Miller, J.M., Jenny, A.L., y Ellingson, J.L. (1999) Polymerase chain reaction identification of *Mycobacterium avium* in formalin-fixed, paraffin-embedded animal tissues. *J Vet Diagn Invest* **11**: 436-440.

- Minas, E., Koutsouko-Hartona, M., Papasawas, y Tsantas, H. (1994) Epidimiologiki erevna sta poimnia provaton kai aigon stis Vorceis Sporades gia parafymatiosi kai proiousa pnevmonia. *Deltion tis EllinikisKtiniatrikis Etaireias* **45**: 25-30.
- Möbius, P., Hotzel, H., Rassbach, A., y Kohler, H. (2008) Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMar2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* **126**: 324-333.
- Möbius, P., Luyven, G., Hotzel, H., y Kohler, H. (2008) High genetic diversity among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from German cattle herds shown by combination of IS900 restriction fragment length polymorphism analysis and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat typing. *J Clin Microbiol* **46**: 972-981.
- Möbius, P., Fritsch, I., Luyven, G., Hotzel, H., y Kohler, H. (2009) Unique genotypes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains of Type III. *Vet Microbiol* **139**: 398-404.
- Mohamed, A.M., Iwen, P.C., Tarantolo, S., y Hinrichs, S.H. (2004) *Mycobacterium nebraskense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic species. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2057-2060.
- Mokresh, A.H., y Butler, D.G. (1990) Granulomatous enteritis following oral inoculation of newborn rabbits with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Can J Vet Res* **54**: 313-319.
- Mokrousov, I., Narvskaya, O., Vyazovaya, A., Millet, J., Otten, T., Vishnevsky, B., y Rastogi, N. (2008) *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Russia: in search of informative variable-number tandem-repeat loci. *J Clin Microbiol* **46**: 3576-3584.
- Moore, M., y Frerichs, J.B. (1953) An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, *Mycobacterium abscessus*, n. sp. *J Invest Dermatol* **20**: 133-169.
- Moreira, A.R., Paolicchi, F., Morsella, C., Zumarraga, M., Cataldi, A., Fabiana, B. y col. (1999) Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. *Vet Microbiol* **70**: 251-259.
- Moriyama, M., Ogawa, K., Nishimori, K., Uchiya, K., Ito, T., Yagi, T. y col. (2006) Usefulness of variable numbers of tandem repeats typing in clinical strains of *Mycobacterium avium*. *Kekkaku* **81**: 559-566.
- Mork, T., Heier, B.T., Alvseike, K.R., y Lund, A. (2003) Overvakings- og kontrollprogrammer for landdyr, fisk og skjell i Norge medvekt på BSE-, salmonella- og paratuberkuloseprogrammene. *Norsk Veterinaertidsskrift* **115**: 707-717.
- Moser, I., Proding, W.M., Hotzel, H., Greenwald, R., Lyashchenko, K.P., Bakker, D. y col. (2008) *Mycobacterium pinnipedii*: transmission from South American sea lion (*Otaria byronia*) to Bactrian camel (*Camelus bactrianus bactrianus*) and Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *Vet Microbiol* **127**: 399-406.
- Motiwala, A.S., Strother, M., Amonsin, A., Byrum, B., Naser, S.A., Stabel, J.R. y col. (2003) Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for limited strain diversity, strain sharing, and identification of unique targets for diagnosis. *J Clin Microbiol* **41**: 2015-2026.
- Motiwala, A.S., Amonsin, A., Strother, M., Manning, E.J., Kapur, V., y Sreevatsan, S. (2004) Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. *J Clin Microbiol* **42**: 1703-1712.
- Motiwala, A.S., Strother, M., Theus, N.E., Stich, R.W., Byrum, B., Shulaw, W.P. y col. (2005) Rapid detection and typing of strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from broth cultures. *J Clin Microbiol* **43**: 2111-2117.

- Motiwalla, A.S., Janagama, H.K., Paustian, M.L., Zhu, X., Bannantine, J.P., Kapur, V., y Sreevatsan, S. (2006) Comparative transcriptional analysis of human macrophages exposed to animal and human isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with diverse genotypes. *Infect Immun* **74**: 6046-6056.
- Motiwalla, A.S., Li, L., Kapur, V., y Sreevatsan, S. (2006) Current understanding of the genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbes Infect* **8**: 1406-1418.
- Moxon, E.R., Rainey, P.B., Nowak, M.A., y Lenski, R.E. (1994) Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr Biol* **4**: 24-33.
- Muehlherr, J.E., Zweifel, C., Corti, S., y Blanco, J.E. (2003) Microbiological quality of raw goats and ewes bulk-tank milk in Switzerland. *J.Dairy Sci* **86**: 3849-3856.
- Muller, B., Steiner, B., Bonfoh, B., Fane, A., Smith, N.H., y Zinsstag, J. (2008) Molecular characterisation of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle slaughtered at the Bamako abattoir in Mali. *BMC Vet Res* **4**: 26.
- Mun, H.S., Kim, H.J., Oh, E.J., Kim, H., Bai, G.H., Yu, H.K. y col. (2007) *Mycobacterium seoulense* sp. nov., a slowly growing scotochromogenic species. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 594-599.
- Mun, H.S., Park, J.H., Kim, H., Yu, H.K., Park, Y.G., Cha, C.Y. y col. (2008) *Mycobacterium sennuense* sp. nov., a slowly growing, non-chromogenic species closely related to the *Mycobacterium terrae* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 641-646.
- Murase, Y., Mitarai, S., Sugawara, I., Kato, S., y Maeda, S. (2008) Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol* **57**: 873-880.
- Murcia, M.I., Tortoli, E., Menendez, M.C., Palenque, E., y García, M.J. (2006) *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2049-2054.
- Murphy, J.T., Sommer, S., Kabara, E.A., Verman, N., Kuelbs, M.A., Saama, P. y col. (2006) Gene expression profiling of monocyte-derived macrophages following infection with *Mycobacterium avium* subspecies *avium* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Physiol Genomics* **28**: 67-75.
- Muskens, J., Barkema, H.W., Russchen, E., van Maanen, K., Schukken, Y.H., y Bakker, D. (2000) Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in The Netherlands. *Vet Microbiol* **77**: 253-261.
- Muskens, J., van Zijderveld, F., Eger, A., y Bakker, D. (2002) Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. *Vet Microbiol* **86**: 269-278.
- Musser, J.M. (2001) Single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* structural genes. *Emerg Infect Dis* **7**: 486-488.
- Nacy, C., y Buckley, M. (2008) *Mycobacterium avium paratuberculosis*: Infrequent human pathogen or public health threat? Report from the *American Academy of Microbiology*. In press.
- Naser, S.A., Schwartz, D., y Shafran, I. (2000) Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *Am J Gastroenterol* **95**: 1094-1095.
- Naser, S.A., Ghobrial, G., Romero, C., y Valentine, J.F. (2004) Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* **364**: 1039-1044.
- Newton, V., McKenna, S.L., y De Buck, J. (2009) Presence of PPE proteins in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates and their immunogenicity in cattle. *Vet Microbiol* **135**: 394-400.
- Nicolas, P., Raphenon, G., Guibourdenche, M., Decousset, L., Stor, R., y Gaye, A.B. (2000) The 1998 Senegal epidemic of meningitis was due to the clonal expansion of A:4:P1.9, clone III-1, sequence type 5 *Neisseria meningitidis* strains. *J Clin Microbiol* **38**: 198-200.

- Nielsen, S.S., Houe, H., Thamsborg, S.M., y Bitsch, V. (2001) Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. *J Vet Diagn Invest* **13**: 164-166.
- Nielsen, S.S., y Toft, N. (2009) A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med* **88**: 1-14.
- Nightingale, S.D., Byrd, L.T., Southern, P.M., Jockusch, J.D., Cal, S.X., y Wynne, B.A. (1992) Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Infect Dis* **165**: 1082-1085.
- Nigou, J., Gilleron, M., y Puzo, G. (2003) Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie* **85**: 153-166.
- Nikolaevskii, V.V., Balabanova, I., Brown, T., Drobniewski, F.A., y Fedorin, I.M. (2005) Molecular typing of the *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in central Russia: efficiency of spoligotyping and VNTR-MIRU. *Mol Gen Mikrobiol Virusol.* **4**: 9-14.
- Nikolayevskyy, V., Gopaul, K., Balabanova, Y., Brown, T., Fedorin, I., y Drobniewski, F. (2006) Differentiation of tuberculosis strains in a population with mainly Beijing-family strains. *Emerg Infect Dis* **12**: 1406-1413.
- Nordlund, K.V., Goodger, W.J., Pelletier, J., y Collins, M.T. (1996) Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* **208**: 1872-1876.
- O'Doherty, A., O'Grady, D., O'Farrell, K., Smith, T., y Egan, J. (2002) Survey of Johne's disease in imported animals in the Republic of Ireland. *Vet Rec* **150**: 634-636.
- O'Shea, B., Khare, S., Bliss, K., Klein, P., Ficht, T.A., Adams, L.G., y Rice-Ficht, A.C. (2004) Amplified fragment length polymorphism reveals genomic variability among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* **42**: 3600-3606.
- Ocepek, M., Posedi, J., y Pislak, M. (1999) Prevalence of bovine paratuberculosis in Slovenia in 1997 and 1998. *Zbornik VeterinarskeFakultete Univerza Ljubljana* **36**: 111-119.
- Ocepek, M., Krt, B., Pate, M., y Pogacnik, M. (2002) Seroprevalence of paratuberculosis in Slovenia between 1999 and 2001. *Slov.Vet.Res* **39**: 179-185.
- Odumeru, J., Gao, A., Chen, S., Raymond, M., y Mutharia, L. (2001) Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in milk. *Can J Vet Res* **65**: 201-205.
- OIE. (2008) Manual de test diagnósticos y vacunas para animales terrestres, 6ª Edición. *Organización Internacional de Epizootias* (OIE). 1-2.
- Ojo, O., Sheehan, S., Corcoran, G.D., Okker, M., Gover, K., Nikolayevsky, V. y col. (2008) *Mycobacterium bovis* strains causing smear-positive human tuberculosis, Southwest Ireland. *Emerg Infect Dis* **14**: 1931-1934.
- Okazaki, M., Ohkusu, K., Hata, H., Ohnishi, H., Sugahara, K., Kawamura, C. y col. (2009) *Mycobacterium kyorinense* sp. nov., a novel, slow-growing species, related to *Mycobacterium celatum*, isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 1336-1341.ç
- Olano, J., Lopez, B., Reyes, A., Lemos, M.P., Correa, N., Del Portillo, P. y col. (2007) Mutations in DNA repair genes are associated with the Haarlem lineage of *Mycobacterium tuberculosis* independently of their antibiotic resistance. *Tuberculosis (Edinb)* **87**: 502-508.
- Olsen, I., Wiker, H.G., Johnson, E., Langeggen, H., y Reitan, L.J. (2001) Elevated antibody responses in patients with Crohn's disease against a 14-kDa secreted protein purified from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Scand J Immunol* **53**: 198-203.

- Olsen, I., Johansen, T.B., Billman-Jacobe, H., Nilsen, S.F., y Djonne, B. (2004) A novel IS element, ISMpa1, in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* **98**: 297-306.
- Olsen, I., Balasingham, S.V., Davidsen, T., Debebe, E., Rodland, E.A., van Soolingen, D. y col. (2009) Characterization of the major formamidopyrimidine-DNA glycosylase homolog in *Mycobacterium tuberculosis* and its linkage to variable tandem repeats. *FEMS Immunol Med Microbiol* **56**: 151-161.
- Orti, G., Pearse, D.E., y Avise, J.C. (1997) Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10745-10749.
- Overduin, P., Schouls, L., Roholl, P., van der Zanden, A., Mahmmoud, N., Herrewegh, A., y van Soolingen, D. (2004) Use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* **42**: 5022-5028.
- Ozbek, A., Michel, F.C., Strother, M., Motiwala, A.S., Byrum, B.R., Shulaw, W.P. y col. (2003) Evaluation of two recovery methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR: direct-dilution--centrifugation and C (18)-carboxypropylbetaine processing. *FEMS Microbiol Lett* **229**: 145-151.
- Padgett, P.J., y Moshier, S.E. (1987) *Mycobacterium poriferae* sp. nov., a scotochromogenic, rapidly growing species isolated from a marine sponge. *Int.J.Syst.Bacteriol* **37**: 186-191.
- Parker, S.L., Tsai, Y.L., y Palmer, C.J. (1995) Comparison of PCR-generated fragments of the mce gene from *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum*. *Clin Diagn Lab Immunol* **2**: 770-775.
- Parkes, M., Barrett, J.C., Prescott, N.J., Tremelling, M., Anderson, C.A., Fisher, S.A. y col. (2007) Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* **39**: 830-832.
- Parra, A., Fernandez-Llario, P., Tato, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J.M. y col. (2003) Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Vet Microbiol* **97**: 123-133.
- Parra, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J.M., y de Mendoza, J.H. (2005) Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: a first approach to risk factor analysis. *Vet Microbiol* **110**: 293-300.
- Patel, D., Danelishvili, L., Yamazaki, Y., Alonso, M., Paustian, M.L., Bannantine, J.P. y col. (2006) The ability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to enter bovine epithelial cells is influenced by preexposure to a hyperosmolar environment and intracellular passage in bovine mammary epithelial cells. *Infect Immun* **74**: 2849-2855.
- Paustian, M.L., Amonsin, A., Kapur, V., y Bannantine, J.P. (2004) Characterization of novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for diagnosis of Johne's Disease. *J Clin Microbiol* **42**: 2675-2681.
- Paustian, M.L., Kapur, V., y Bannantine, J.P. (2005) Comparative genomic hybridizations reveal genetic regions within the *Mycobacterium avium* complex that are divergent from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. *J Bacteriol* **187**: 2406-2415.
- Paustian, M.L., Zhu, X., Sreevatsan, S., Robbe-Austerman, S., Kapur, V., y Bannantine, J.P. (2008) Comparative genomic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies obtained from multiple host species. *BMC Genomics* **9**: 135.
- Pavlik, I., Bejckova, L., Pavlas, M., Rozsypalova, Z., y Koskova, S. (1995) Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet Microbiol* **45**: 311-318.
- Pavlik, I., Horvathova, A., Dvorska, L., Bartl, J., Svastova, P., du Maine, R., y Rychlik, I. (1999) Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J Microbiol Methods* **38**: 155-167.

- Pavlik, I., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., du Maine, R., Machackova, M. y col. (2000) Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Vet Microbiol* **77**: 231-251.
- Perdigao, J., Macedo, R., Ribeiro, A., Brum, L., y Portugal, I. (2009) Genetic characterisation of the ethambutol resistance-determining region in *Mycobacterium tuberculosis*: prevalence and significance of embB306 mutations. *Int J Antimicrob Agents* **33**: 334-338.
- Pérez, V., García Marín, J.F., y Badiola, J.J. (1996) Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J Comp Pathol* **114**: 107-122.
- Perret, X., Viprey, V., Freiberg, C., y Broughton, W.J. (1997) Structure and evolution of NGRRS-1, a complex, repeated element in the genome of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J Bacteriol* **179**: 7488-7496.
- Petit, E. (2001) Enquete serologique sur la paratuberculose bovine menee dans l'Yonne lors de la campagne 98-99. *Epidemiol.Sante Anim* **40**: 23-29.
- Pickup, R.W., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T.J., Weightman, A. y col. (2005) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2130-2139.
- Pickup, R.W., Rhodes, G., Bull, T.J., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Hurley, M., y Hermon-Taylor, J. (2006) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4067-4077.
- Pietzka, A.T., Indra, A., Stoger, A., Zeinzinger, J., Konrad, M., Hasenberger, P. y col. (2009) Rapid identification of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by *rpoB* gene scanning using high-resolution melting curve PCR analysis. *J Antimicrob Chemother* **63**: 1121-1127.
- Platt, R., Thoen, C.O., Stalberger, R.J., Chiang, Y.W., y Roth, J.A. (2010) Evaluation of the cell-mediated immune response to reduced doses of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* vaccine in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. In press.
- Portaels, F., y Pattyn, S.R. (1982) Growth of mycobacteria in relation to the pH of the medium. *Ann Microbiol (Paris)* **133**: 213-221.
- Poupart, P., Coene, M., van Heuverswyn, H., y Cocito, C. (1993) Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *J Clin Microbiol* **31**: 1601-1605.
- Pourahmad, F., Cervellione, F., Thompson, K.D., Taggart, J.B., Adams, A., y Richards, R.H. (2008) *Mycobacterium stomatepieae* sp. nov., a slowly growing, non-chromogenic species isolated from fish. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 2821-2827.
- Pribylova, R., Kralik, P., y Pavlik, I. (2009) Oligonucleotide microarray technology and its application to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* research: a review. *Mol Biotechnol* **42**: 30-40.
- Prinzis, S., Chatterjee, D., y Brennan, P.J. (1993) Structure and antigenicity of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. *J Gen Microbiol* **139**: 2649-2658.
- Probert, C.S., Jayanthi, V., Rampton, D.S., y Mayberry, J.F. (1996) Epidemiology of inflammatory bowel disease in different ethnic and religious groups: limitations and aetiological clues. *Int J Colorectal Dis* **11**: 25-28.
- Prodinger, W.M., Brandstatter, A., Naumann, L., Pacciarini, M., Kubica, T., Boschirol, M.L. y col. (2005) Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J Clin Microbiol* **43**: 4984-4992.

- Quadri, L.E., Sello, J., Keating, T.A., Weinreb, P.H., y Walsh, C.T. (1998) Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem Biol* **5**: 631-645.
- Rajeev, S., Zhang, Y., Sreevatsan, S., Motiwala, A.S., y Byrum, B. (2005) Evaluation of multiple genomic targets for identification and confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates using real-time PCR. *Vet Microbiol* **105**: 215-221.
- Ramaswamy, S.V., Reich, R., Dou, S.J., Jasperse, L., Pan, X., Wanger, A. y col. (2003) Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1241-1250.
- Rankin, J.D. (1961) The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei* III. Calves maintained in an infectious environment. *J Comp Pathol* **71**: 10-15.
- Reddacliff, L., Eppleston, J., Windsor, P., Whittington, R., y Jones, S. (2006) Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet Microbiol* **115**: 77-90.
- Reed, G.B. (1957) Genus *Mycobacterium* (species affecting warm-blooded animals except those causing leprosy). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed 703-704.
- Reischl, U., Emler, S., Horak, Z., Kaustova, J., Kroppenstedt, R.M., Lehn, N., y Naumann, L. (1998) *Mycobacterium bohemicum* sp. nov., a new slow-growing scotochromogenic mycobacterium. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 4**: 1349-1355.
- Reischl, U., Melzl, H., Kroppenstedt, R.M., Miethke, T., Naumann, L., Mariottini, A. y col. (2006) *Mycobacterium monacense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2575-2578.
- Reviriego, F.J., Moreno, M.A., y Domínguez, L. (2000) Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. *Prev Vet Med* **43**: 43-51.
- Rhodes, M.W., Kator, H., Kotob, S., van Berkum, P., Kaattari, I., Vogelbein, W. y col. (2003) *Mycobacterium shottsii* sp. nov., a slowly growing species isolated from Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*). *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 421-424.
- Rhodes, M.W., Kator, H., McNabb, A., Deshayes, C., Reyrat, J.M., Brown-Elliott, B.A. y col. (2005) *Mycobacterium pseudoshottsii* sp. nov., a slowly growing chromogenic species isolated from Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*). *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 1139-1147.
- Ritacco, V., Kremer, K., van der Laan, T., Pijnenburg, J.E., de Haas, P.E., y van Soolingen, D. (1998) Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int J Tuberc Lung Dis* **2**: 242-251.
- Ritcher, E., Niemann, S., Gloeckner, F.O., Pfyffer, G.E., y Rusch-Gerdes, S. (2002) *Mycobacterium holsaticum* sp. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol* 1991-1996. In press.
- Robbi, C., Rossi, I., Nardelli, S., Rossi, E., Toson, M., Marangon, S. y col. (2002) Prevalenza di Paratubercolosi (John's disease) nella popolazione di bovine da latte della Regione Veneto. Atti della Società Italiana di Buiatria **34**: 283-288.
- Roiz, M.P., Palenque, E., Guerrero, C., y García, M.J. (1995) Use of restriction fragment length polymorphism as a genetic marker for typing *Mycobacterium avium* strains. *J Clin Microbiol* **33**: 1389-1391.
- Romano, M.I., Amadio, A., Bigi, F., Klepp, L., Etchehoury, I., Llana, M.N. y col. (2005) Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. *Vet Microbiol* **110**: 221-237.
- Romero, B., Aranaz, A., de Juan, L., Álvarez, J., Bezós, J., Mateos, A. y col. (2006) Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. *J Clin Microbiol* **44**: 3405-3408.

- Romero, B., Aranaz, A., Sandoval, A., Álvarez, J., de Juan, L., Bezos, J. y col. (2008) Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Donana National Park revealed by genotype variation. *Vet Microbiol* **132**: 87-95.
- Roring, S., Scott, A., Brittain, D., Walker, I., Hewinson, G., Neill, S., y Skuce, R. (2002) Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J Clin Microbiol* **40**: 2126-2133.
- Roring, S., Scott, A.N., Glyn, H.R., Neill, S.D., y Skuce, R.A. (2004) Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Vet Microbiol* **101**: 65-73.
- Roth, A., Reischl, U., Schonfeld, N., Naumann, L., Emler, S., Fischer, M. y col. (2000) *Mycobacterium beckeshornense* sp. nov., A new pathogenic slowly growing *Mycobacterium* sp. Causing cavitary lung disease in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol* **38**: 4102-4107.
- Rowbotham, D.S., Mapstone, N.P., Trejdosiewicz, L.K., Howdle, P.D., y Quirke, P. (1995) *Mycobacterium paratuberculosis* DNA not detected in Crohn's disease tissue by fluorescent polymerase chain reaction. *Gut* **37**: 660-667.
- Runyon, E.H. (1959) Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am* **43**: 273-290.
- Saito, H., Tomioka, H., Sato, K., Tasaka, H., y Dawson, D.J. (1990) Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex by using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J Clin Microbiol* **28**: 1694-1697.
- Sajduda, A., Dziadek, J., Kotlowski, R., y Portaels, F. (2006) Evaluation of multiple genetic markers for typing drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Poland. *Diagn Microbiol Infect Dis* **55**: 59-64.
- Sakamuri, R.M., Kimura, M., Li, W., Kim, H.C., Lee, H., Kiran, M.D. y col. (2009) Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines. *J Clin Microbiol* **47**: 2844-2854.
- Salgado, M., Herthnek, D., Bolske, G., Leiva, S., y Kruze, J. (2009) First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from wild guanacos (*Lama guanicoe*) on Tierra del Fuego Island. *J Wildl Dis* **45**: 295-301.
- Sanna, E., Woodall, C.J., Watt, N.J., Clarke, C.J., Pittau, M., Leoni, A., y Nieddu, A.M. (2000) In situ-PCR for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in paraffin-embedded tissues. *Eur J Histochem* **44**: 179-184.
- Santema, W., Hensen, S., Rutten, V., y Koets, A. (2009) Heat shock protein 70 subunit vaccination against bovine paratuberculosis does not interfere with current immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vaccine* **27**: 2312-2319.
- Sartor, R. B. (2005) Does *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* causes Crohn's disease? *Gut* **54**: 896-898.
- Savine, E., Warren, R.M., van der Spuy, G.D., Beyers, N., van Helden, P.D., Locht, C., y Supply, P. (2002) Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **40**: 4561-4566.
- Saxegaard, F., y Fodstad, F.H. (1985) Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. *Vet Rec* **116**: 439-441.
- Scanu, A.M., Bull, T.J., Cannas, S., Sanderson, J.D., Sechi, L.A., Dettori, G. y col. (2007) *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: common neural and immune pathogenicities. *J Clin Microbiol* **45**: 3883-3890.
- Scarpellini, P., Braglia, S., Carrera, P., Cedri, M., Cichero, P., Colombo, A. y col. (1999) Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 2550-2554.

- Scarpellini, P., Carrera, P., Cichero, P., Gelfi, C., Gori, A., Ferrari, M. y col. (2003) Detection of resistance to isoniazid by denaturing gradient-gel electrophoresis DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *New Microbiol* **26**: 345-351.
- Schaefer, W.B. (1965) Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. *Am Rev Respir Dis* **92**: 85-93.
- Schinsky, M.F., McNeil, M.M., Whitney, A.M., Steigerwalt, A.G., Lasker, B.A., Floyd, M.M. y col. (2000) *Mycobacterium septicum* sp. nov., a new rapidly growing species associated with catheter-related bacteraemia. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 2**: 575-581.
- Schinsky, M.F., Morey, R.E., Steigerwalt, A.G., Douglas, M.P., Wilson, R.W., Floyd, M.M. y col. (2004) Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1653-1667.
- Schlotterer, C., y Tautz, D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* **20**: 211-215.
- Schonenbrucher, H., Abdulmawjood, A., Failing, K., y Bulte, M. (2008) New triplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2751-2758.
- Schröder, K.H., y Juhlin, I. (1977) *Mycobacterium malmoense* sp. nov. *Int.J.Syt.Bacteriol* **27**: 241-246.
- Schröder, K.H., Naumann, L., Kroppenstedt, R.M., y Reischl, U. (1997) *Mycobacterium hassiacum* sp. nov., a new rapidly growing thermophilic mycobacterium. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 86-91.
- Schwabacher, H. (1959) A strain of *Mycobacterium* isolated from skin lesions of a cold-blooded animal, *Xenopus laevis*, and its relation to atypical acid-fast bacilli occurring in man. *J Hyg (Lond)* **57**: 57-67.
- Scott, H.M., Fosgate, G.T., Libal, M.C., Sneed, L.W., Erol, E., Angulo, A.B., y Jordan, E.R. (2007) Field testing of an enhanced direct-fecal polymerase chain reaction procedure, bacterial culture of feces, and a serum enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in adult dairy cattle. *Am J Vet Res* **68**: 236-245.
- Secott, T.E., Lin, T.L., y Wu, C.C. (2004) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect Immun* **72**: 3724-3732.
- Selby, W., Pavli, P., Crotty, B., Florin, T., Radford-Smith, G., Gibson, P. y col. (2007) Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology* **132**: 2313-2319.
- Semret, M., Zhai, G., Mostowy, S., Cleto, C., Alexander, D., Cangelosi, G. y col. (2004) Extensive genomic polymorphism within *Mycobacterium avium*. *J Bacteriol* **186**: 6332-6334.
- Semret, M., Alexander, D.C., Turenne, C.Y., de Haas, P., Overduin, P., van Soolingen, D. y col. (2005) Genomic polymorphisms for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* diagnostics. *J Clin Microbiol* **43**: 3704-3712.
- Semret, M., Turenne, C.Y., y Behr, M.A. (2006) Insertion sequence IS900 revisited. *J Clin Microbiol* **44**: 1081-1083.
- Semret, M., Turenne, C.Y., de Haas, P., Collins, D.M., y Behr, M.A. (2006) Differentiating host-associated variants of *Mycobacterium avium* by PCR for detection of large sequence polymorphisms. *J Clin Microbiol* **44**: 881-887.
- Sergeant, E.S., Marshall, D.J., Eamens, G.J., Kearns, C., y Whittington, R.J. (2003) Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev Vet Med* **61**: 235-248.

- Sevilla, I., Singh, S.V., Garrido, J.M., Aduriz, G., Rodríguez, S., Geijo, M.V. y col. (2005) Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Rev Sci Tech* **24**: 1061-1066.
- Sevilla, I., Garrido, J.M., Geijo, M., y Juste, R.A. (2007) Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. *BMC Microbiol* **7**: 18.
- Sevilla, I., Li, L., Amonsin, A., Garrido, J.M., Geijo, M.V., Kapur, V., y Juste, R.A. (2008) Comparative analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle, sheep and goats by short sequence repeat and pulsed-field gel electrophoresis typing. *BMC Microbiol* **8**: 204.
- Shamputa, I.C., Rigouts, L., Eyongeta, L.A., El Aila, N.A., van Deun, A., Salim, A.H. y col. (2004) Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* **42**: 5528-5536.
- Sharples, G.J., y Lloyd, R.G. (1990) A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res* **18**: 6503-6508.
- Sherman, D.M., Markham, R.J., y Bates, F. (1984) Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc* **185**: 179-182.
- Sherman, D.M., Gay, J.M., Bouley, D.S., y Nelson, G.H. (1990) Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *Am J Vet Res* **51**: 461-465.
- Shimono, N., Morici, L., Casali, N., Cantrell, S., Sidders, B., Ehrt, S., y Riley, L.W. (2003) Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the *mce1* operon. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 15918-15923.
- Shin, S.J., Chang, Y.F., Huang, C., Zhu, J., Huang, L., Yoo, H.S. y col. (2004) Development of a polymerase chain reaction test to confirm *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in culture. *J Vet Diagn Invest* **16**: 116-120.
- Shin, S.J., Wu, C.W., Steinberg, H., y Talaat, A.M. (2006) Identification of novel virulence determinants in *Mycobacterium paratuberculosis* by screening a library of insertional mutants. *Infect Immun* **74**: 3825-3833.
- Shinnick, T.M., y Good, R.C. (1994) Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **13**: 884-901.
- Shojaei, H., Goodfellow, M., Magee, J.G., Freeman, R., Gould, F.K., y Brignall, C.G. (1997) *Mycobacterium novocastrense* sp. nov., a rapidly growing photochromogenic mycobacterium. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 1205-1207.
- Shojaei, H., Magee, J.G., Freeman, R., Yates, M., Horadagoda, N.U., y Goodfellow, M. (2000) *Mycobacterium elephantis* sp. nov., a rapidly growing non-chromogenic *Mycobacterium* isolated from an elephant. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 5**: 1817-1820.
- Shu, D., Chen, L., Wang, W., Yu, Z., Ren, C., Zhang, W. y col. (2009) *AfsQ1-Q2-sigQ* is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**: 1149-1160.
- Sibley, J.A., Woodbury, M.R., Appleyard, G.D., y Elkin, B. (2007) *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Bison (*Bison bison*) from Northern Canada. *J Wildl Dis* **43**: 775-779.
- Sigurdardottir, O.G., Nordstoga, K., Baustad, B., y Saxegaard, F. (1994) Granulomatous enteritis in a pig caused by *Mycobacterium avium*. *Vet Pathol* **31**: 274-276.
- Singh, S.V., Singh, A.V., Singh, R., Sharma, S., Shukla, N., Misra, S. y col. (2008) Sero-prevalence of bovine Johne's disease in buffaloes and cattle population of North India using indigenous ELISA kit based on native *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* 'Bison type' genotype of goat origin. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **31**: 419-433.

- Singh, S.V., Sohal, J.S., Singh, P.K., y Singh, A.V. (2009) Genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates recovered from animals, commercial milk, and human beings in North India. *Int J Infect Dis* **13**: e221-e227.
- Sivakumar, P., Tripathi, B.N., y Singh, N. (2005) Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Vet Microbiol* **108**: 263-270.
- Skovgaard, K., Grell, S.N., Heegaard, P.M., Jungersen, G., Pudrith, C.B., y Coussens, P.M. (2006) Differential expression of genes encoding CD30L and P-selectin in cattle with Johne's disease: progress toward a diagnostic gene expression signature. *Vet Immunol Immunopathol* **112**: 210-224.
- Skuce, R.A., McCorry, T.P., McCarroll, J.F., Roring, S.M., Scott, A.N., Brittain, D. y col. (2002) Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* **148**: 519-528.
- Skuce, R.A., McDowell, S.W., Mallon, T.R., Luke, B., Breadon, E.L., Lagan, P.L. y col. (2005) Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable numbers of tandem repeats (VNTRs). *Vet Rec* **157**: 501-504.
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., y Pavlik, I. (2008) On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *Int J Food Microbiol* **128**: 250-257.
- Slana, I., Liapi, M., Moravkova, M., Kralova, A., y Pavlik, I. (2009) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow bulk tank milk in Cyprus detected by culture and quantitative IS900 and F57 real-time PCR. *Prev Vet Med* **89**: 223-226.
- Smith, N.H., Dale, J., Inwald, J., Palmer, S., Gordon, S.V., Hewinson, R.G., y Smith, J.M. (2003) The population structure of *Mycobacterium bovis* in Great Britain: clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 15271-15275.
- Smith, N.H., Crawshaw, T., Parry, J., y Birtles, R. J. (2009) *Mycobacterium microti*: More diverse than previously thought. *J Clin Microbiol* **47**: 2551-2559.
- Smittipat, N., Billamas, P., Palittapongarnpim, M., Thong-On, A., Temu, M.M., Thanakijcharoen, P. y col. (2005) Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **43**: 5034-5043.
- Sohal, J.S., Sheoran, N., Narayanasamy, K., Brahmachari, V., Singh, S., y Subodh, S. (2009) Genomic analysis of local isolate of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* **134**: 375-382.
- Sohal, J.S., Singh, S.V., Singh, P.K., and Singh, A.V. (2009) On the evolution of 'Indian Bison type' strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Microbiol Res*. In press.
- Sola, C., Ferdinand, S., Mammina, C., Nastasi, A., y Rastogi, N. (2001) Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily based on spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with a spoligotyping database for population-based analysis. *J Clin Microbiol* **39**: 1559-1565.
- Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Lesjean, S., Loch, C., Supply, P., y Rastogi, N. (2003) Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol* **3**: 125-133.
- Sompolinsky, D., Lagziel, A., Naveh, D., y Yankilevitz, T. (1978) *M. haemophilum* sp. nov., a new pathogen of humans. *Int.J.Syst.Bacteriol* **28**: 67-75.
- Speer, C.A., Scott, M.C., Bannantine, J.P., Waters, W.R., Mori, Y., Whitlock, R.H., y Eda, S. (2006) A novel enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections (Johne's Disease) in cattle. *Clin Vaccine Immunol* **13**: 535-540.

- Springer, B., Kirschner, P., Rost-Meyer, G., Schroder, K.H., Kroppenstedt, R.M., y Bottger, E.C. (1993) *Mycobacterium interjectum*, a new species isolated from a patient with chronic lymphadenitis. *J Clin Microbiol* **31**: 3083-3089.
- Springer, B., Bottger, E.C., Kirschner, P., y Wallace, R.J., Jr. (1995) Phylogeny of the *Mycobacterium chelonae*-like organism based on partial sequencing of the 16S rRNA gene and proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 262-267.
- Springer, B., Tortoli, E., Richter, I., Grunewald, R., Rusch-Gerdes, S., Uschmann, K. y col. (1995) *Mycobacterium conspicuum* sp. nov., a new species isolated from patients with disseminated infections. *J Clin Microbiol* **33**: 2805-2811.
- Springer, B., Wu, W.K., Bodmer, T., Haase, G., Pfyffer, G.E., Kroppenstedt, R.M. y col. (1996) Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. *J Clin Microbiol* **34**: 1100-1107.
- Spurgiesz, R.S., Quitugua, T.N., Smith, K.L., Schupp, J., Palmer, E.G., Cox, R.A., y Keim, P. (2003) Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by using nine novel variable-number tandem repeats across the Beijing family and low-copy-number IS6110 isolates. *J Clin Microbiol* **41**: 4224-4230.
- Sreenu, V.B., Kumar, P., Nagaraju, J., y Nagarajam, H.A. (2007) Simple sequence repeats in mycobacterial genomes. *J Biosci* **32**: 3-15.
- Stabel, J.R., y Bannantine, J.P. (2005) Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J Clin Microbiol* **43**: 4744-4750.
- Stanford, J.L., y Gunthorpe, W.J. (1971) A study of some fast-growing scotochromogenic mycobacteria including species descriptions of *Mycobacterium gilvum* (new species) and *Mycobacterium dualii* (new species). *Br J Exp Pathol* **52**: 627-637.
- Stärk, C., Frei-Staheli, P.P., Frei, D.U., Pfeiffer, J., Danuser, L., Audige, J. y col. (1997) Häufigkeit und Kosten von Gesundheitsproblemen bei Schweizer Milchkühen und deren Kalbern (1993-1994). *Schweiz. Arch. Tierheilkd* **343**: 343-345.
- Stavrum, R., Mphahlele, M., Ovreas, K., Muthivhi, T., Fourie, P.B., Weyer, K., y Grewal, H.M. (2009) High diversity of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in South Africa and preponderance of mixed infections among ST53 isolates. *J Clin Microbiol* **47**: 1848-1856.
- Stehman, S.M. (1996) Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **12**: 441-455.
- Stephan, R., Schumacher, S., Tasara, T., y Grant, I.R. (2007) Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. *J Dairy Sci* **90**: 3590-3595.
- Stern, M.J., Ames, G.F., Smith, N.H., Robinson, E.C., y Higgins, C.F. (1984) Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* **37**: 1015-1026.
- Sternberg, S., y Viske, D. (2003) Control strategies for paratuberculosis in Sweden. *Acta Vet Scand* **44**: 247-249.
- Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., y Sharp, J.M. (2002) Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* **40**: 1798-1804.
- Stevenson, K., Álvarez, J., Bakker, D., Biet, F., de Juan, L., Denham, S. y col. (2009) Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol* **9**: 212.

- Stich, R. W., Byrumb, B., Loveb, B., Theusa, N., Barberb, L. y Shulawa, W. P. (2004) Evaluation of an automated system for non-radiometric detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in bovine feces. *J Microbiol Methods* **56**: 267-275.
- Stragier, P., Ablordey, A., Bayonne, L.M., Lugor, Y.L., Sindani, I.S., Suykerbuyk, P. y col. (2006) Heterogeneity among *Mycobacterium ulcerans* isolates from Africa. *Emerg Infect Dis* **12**: 844-847.
- Stratmann, J., Strommenger, B., Stevenson, K., y Gerlach, G.F. (2002) Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J Clin Microbiol* **40**: 4244-4250.
- Stratmann, J., Strommenger, B., Goethe, R., Dohmann, K., Gerlach, G.F., Stevenson, K. y col. (2004) A 38-kilobase pathogenicity island specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* encodes cell surface proteins expressed in the host. *Infect Immun* **72**: 1265-1274.
- Stratmann, J., Dohmann, K., Heinzmann, J., y Gerlach, G.F. (2006) Peptide aMptD-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bulk milk samples. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5150-5158.
- Strommenger, B., Stevenson, K., y Gerlach, G.F. (2001) Isolation and diagnostic potential of IS*Map*2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* **196**: 31-37.
- Stuart, P. (1965) Vaccination against Johne's disease in cattle exposed to experimental infection. *Br Vet J* **121**: 289-318.
- Sun, Y.J., Lee, A.S., Ng, S.T., Ravindran, S., Kremer, K., Bellamy, R. y col. (2004) Characterization of ancestral *Mycobacterium tuberculosis* by multiple genetic markers and proposal of genotyping strategy. *J Clin Microbiol* **42**: 5058-5064.
- Sun, Y.J., Lee, A.S., Wong, S.Y., y Paton, N.I. (2007) Analysis of the role of *Mycobacterium tuberculosis* *kasA* gene mutations in isoniazid resistance. *Clin Microbiol Infect* **13**: 833-835.
- Supply, P., Magdalena, J., Himpens, S., y Loch, C. (1997) Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol* **26**: 991-1003.
- Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., y Loch, C. (2000) Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* **36**: 762-771.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rusch-Gerdes, S., Willery, E. y col. (2006) Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **44**: 4498-4510.
- Surikova, O.V., Voitech, D.S., Kuzmicheva, G., Tatkov, S.I., Mokrousov, I.V., Narvskaya, O.V. y col. (2005) Efficient differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family from Russia using highly polymorphic VNTR loci. *Eur J Epidemiol* **20**: 963-974.
- Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Bowersock, T.L., Cleary, D.L., Meinert, T.R., Habecker, P.L., y Pruitt, G.W. (2009) Effect of subcutaneous administration of a killed *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccine on colonization of tissues following oral exposure to the organism in calves. *Am J Vet Res* **70**: 493-497.
- Tadayon, K., Mosavari, N., Sadeghi, F., y Forbes, K.J. (2008) *Mycobacterium bovis* infection in Holstein Friesian cattle, Iran. *Emerg Infect Dis* **14**: 1919-1921.
- Tafaj, S., Zhang, J., Hauck, Y., Pourcel, C., Hafizi, H., Zoraqi, G., y Sola, C. (2009) First insight into genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in Albania obtained by multilocus variable-number tandem-repeat analysis and spoligotyping reveals the presence of Beijing multidrug-resistant isolates. *J Clin Microbiol* **47**: 1581-1584.
- Talarico, S., Cave, M.D., Foxman, B., Marrs, C.F., Zhang, L., Bates, J.H., y Yang, Z. (2007) Association of *Mycobacterium tuberculosis* PE PGRS33 polymorphism with clinical and epidemiological characteristics. *Tuberculosis (Edinb)* **87**: 338-346.

- Tasara, T., Hoelzle, L.E., y Stephan, R. (2005) Development and evaluation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) specific multiplex PCR assay. *Int J Food Microbiol* **104**: 279-287.
- Tasara, T., y Stephan, R. (2005) Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5957-5968.
- Tazi, L., Reintjes, R., y Banuls, A.L. (2007) Tuberculosis transmission in a high incidence area: a retrospective molecular epidemiological study of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, Morocco. *Infect Genet Evol* **7**: 636-644.
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E.C., y Bodmer, T. (1993) Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* **31**: 175-178.
- Tharaldsen, J., Djonne, B., Frediksen, B., Nyberg, O., y Siguroardottir, O. (2003) The National Paratuberculosis Program in Norway. *Acta Vet.Scand* **44**: 243-246.
- Thibault, V.C., Grayon, M., Boschioli, M.L., Hubbans, C., Overduin, P., Stevenson, K. y col. (2007) New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol* **45**: 2404-2410.
- Thibault, V.C., Grayon, M., Boschioli, M.L., Willery, E., Allix-Beguec, C., Stevenson, K. y col. (2008) Combined multilocus short-sequence-repeat and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* **46**: 4091-4094.
- Thorel, M.F., Krichevsky, M., y Levy-Frebault, V.V. (1990) Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **40**: 254-260.
- Thorel, M.F., Huchzermeyer, H., Weiss, R., y Fontaine, J.J. (1997) *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. *Vet Res* **28**: 439-447.
- Thoresen, O.F., y Olsaker, I. (1994) Distribution and hybridization patterns of the insertion element IS900 in clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol* **40**: 293-303.
- Timpe, A., y Runyon, E.H. (1954) The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *J Lab Clin Med* **44**: 202-209.
- Tizard, M.L., Moss, M.T., Sanderson, J.D., Austen, B.M., y Hermon-Taylor, J. (1992) p43, the protein product of the atypical insertion sequence IS900, is expressed in *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Gen Microbiol* **138 Pt 8**: 1729-1736.
- Tobin-D'Angelo, M.J., Blass, M.A., del Río, C., Halvosa, J.S., Blumberg, H.M., y Horsburgh, C.R., Jr. (2004) Hospital water as a source of *Mycobacterium avium* complex isolates in respiratory specimens. *J Infect Dis* **189**: 98-104.
- Tobler, N.E., Pfunder, M., Herzog, K., Frey, J.E., y Altwegg, M. (2006) Rapid detection and species identification of *Mycobacterium* spp. using real-time PCR and DNA-microarray. *J Microbiol Methods* **66**: 116-124.
- Torkko, P., Suomalainen, S., Iivanainen, E., Suutari, M., Tortoli, E., Paulin, L., y Katila, M.L. (2000) *Mycobacterium xenopi* and related organisms isolated from stream waters in Finland and description of *Mycobacterium botniense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 1**: 283-289.
- Torkko, P., Suomalainen, S., Iivanainen, E., Tortoli, E., Suutari, M., Seppanen, J. y col. (2002) *Mycobacterium palustre* sp. nov., a potentially pathogenic, slowly growing mycobacterium isolated from clinical and veterinary specimens and from Finnish stream waters. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1519-1525.

- Torres-Avila, J.F., Colorado, C.L., Gamboa, L.A., Araujo, M.J., Leon-Franco, C.I., y Guerrero-Guerrero, M.I. (2009) Genotyping Colombian *Mycobacterium leprae* for determining disease transmission patterns. *Rev Salud Publica (Bogota)* **11**: 3-13.
- Tortoli, E., Kroppenstedt, R.M., Bartoloni, A., Caroli, G., Jan, I., Pawlowski, J., y Emler, S. (1999) *Mycobacterium tusciae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**: 1839-1844.
- Tortoli, E., Piersimoni, C., Kroppenstedt, R.M., Montoya-Burgos, J.I., Reischl, U., Giacometti, A., y Emler, S. (2001) *Mycobacterium doricum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 2007-2012.
- Tortoli, E. (2003) Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* **16**: 319-354.
- Tortoli, E., Rindi, L., García, M.J., Chiaradonna, P., Dei, R., Garzelli, C. y col. (2004) Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1277-1285.
- Tortoli, E., Rindi, L., Goh, K.S., Katila, M.L., Mariottini, A., Mattei, R. y col. (2005) *Mycobacterium florentinum* sp. nov., isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 1101-1106.
- Tortoli, E., Baruzzo, S., Heijdra, Y., Klenk, H.P., Lauria, S., Mariottini, A., y van Ingen, J. (2009) *Mycobacterium insubricum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 1518-1523.
- Tracevska, T., Jansone, I., Broka, L., Marga, O., y Baumanis, V. (2002) Mutations in the *rpoB* and *katG* genes leading to drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Latvia. *J Clin Microbiol* **40**: 3789-3792.
- Troesch, A., Nguyen, H., Miyada, C.G., Desvarenne, S., Gingeras, T.R., Kaplan, P.M. y col. (1999) *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* **37**: 49-55.
- Trujillo, M.E., Velazquez, E., Kroppenstedt, R.M., Schumann, P., Rivas, R., Mateos, P.F., y Martinez-Molina, E. (2004) *Mycobacterium psychrotolerans* sp. nov., isolated from pond water near a uranium mine. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1459-1463.
- Truman, R., Fontes, A.B., De Miranda, A.B., Suffys, P., y Gillis, T. (2004) Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol* **42**: 2558-2565.
- Tsukamura, M. (1965) A group of mycobacteria from soil sources resembling nonphotochromogens (group 3). A description of *Mycobacterium nonchromogenicum*. *Igaku to Seibutsugaku* **71**:110-3.
- Tsukamura, M. (1967) *Mycobacterium chitae*: a new species. *Jpn J Microbiol* **11**: 43-47.
- Tsukamura, M., y Mizuno, S. (1971) *Mycobacterium obuense*, a rapidly growing scotochromogenic mycobacterium capable of forming a black product from p-aminosalicylate and salicylate. *J Gen Microbiol* **68**: 129-134.
- Tsukamura, M., Mizuno, S., Gane, N.F., Mills, A., y King, L. (1971) *Mycobacterium rhodesiae* sp. nov. A new species of rapid-growing scotochromogenic mycobacteria. *Jpn J Microbiol* **15**: 407-416.
- Tsukamura, M., y Mizuno, S. (1977) Numerical analysis of relationships among rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria. *J Gen Microbiol* **98**: 511-517.
- Tsukamura, M. (1981) Numerical analysis of rapidly growing, nonphotochromogenic mycobacteria, including *Mycobacterium agri*. *Int.J.Syst.Bacteriol* **31**: 247-258.
- Tsukamura, M., Mizuno, S., y Tsukamura, S. (1981) Numerical analysis of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria, including *Mycobacterium obuense* sp. nov., nom. rev., *Mycobacterium rhodesiae* sp. nov., nom. rev., *Mycobacterium aichiense* sp. nov., nom. rev., *Mycobacterium chubuense* sp. nov., nom. rev., and *Mycobacterium tokaiense* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol* **31**: 263-275.

- Tsukamura, M. (1982) *Mycobacterium shimoidei* sp. nov., nom. rev., a lung pathogen. *Int.J.Syst.Bacteriol* **32**: 67-69.
- Tsukamura, M., Mizuno, S., y Toyama, H. (1983) *Mycobacterium pulveris* sp. nov., a nonphotochromogenic mycobacterium with an intermediate growth rate. *Int.J.Syst.Bacteriol* **33**: 811-815.
- Tsukamura, M., Yano, I., y Imaeda, T. (1986) *Mycobacterium fortuitum* subspecies *acetamidolyticum*, a new subspecies of *Mycobacterium fortuitum*. *Microbiol Immunol* **30**: 97-110.
- Tsukamura, M., Toyama, H., y Mizuno, S. (1966) *Mycobacterium parafortuitum* (a new species). *Igaku To Seibutsugaku* **70**: 232-235.
- Tsukamura, M., y Tsukamura, S. (1966) *Mycobacterium aurum*, a new species. *Igaku To Seibutsugaku* **72**: 270-273.
- Tsukamura, M., van der Meulen, H.J., y Grabow, W.O.K. (1983) Numerical taxonomy of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria of the *Mycobacterium parafortuitum* complex: *Mycobacterium austroafricanum* sp. nov. and *Mycobacterium diernhoferi* sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol* **33**: 460-469.
- Tsukamura, T., Nemoto, H., y Yugi, H. (1983) *Mycobacterium porcinum* sp. nov., a porcine pathogen. *Int.J.Syst.Bacteriol* **33**: 162-165.
- Tsukamura, M., Yano, I., e Imaeda, T. (1986) *Mycobacterium moriokaense* sp. nov., a rapidly growing, nonphotochromogenic *Mycobacterium*. *Int.J.Syst.Bacteriol* **36**: 333-338.
- Tsunematsu, N., Goto, M., Saiki, Y., Baba, M., Udagawa, T., y Kazumi, Y. (2008) Usefulness of the variable numbers of tandem repeats (VNTR) analysis for complex infections of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Kekkaku* **83**: 629-633.
- Turenne, C., Chedore, P., Wolfe, J., Jamieson, F., Broukhanski, G., May, K., y Kabani, A. (2002) *Mycobacterium lacus* sp. nov., a novel slowly growing, non-chromogenic clinical isolate. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 2135-2140.
- Turenne, C.Y., Cook, V.J., Burdz, T.V., Pauls, R.J., Thibert, L., Wolfe, J.N., y Kabani, A. (2004) *Mycobacterium parascrofulaceum* sp. nov., novel slowly growing, scotochromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium simiae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1543-1551.
- Turenne, C.Y., Thibert, L., Williams, K., Burdz, T.V., Cook, V.J., Wolfe, J.N. y col. (2004) *Mycobacterium saskatchewanense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic species from human clinical isolates related to *Mycobacterium interjectum* and Accuprobe-positive for *Mycobacterium avium* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 659-667.
- Turenne, C.Y., Semret, M., Cousins, D.V., Collins, D.M., y Behr, M.A. (2006) Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *J Clin Microbiol* **44**: 433-440.
- Turenne, C.Y., Collins, D.M., Alexander, D.C., y Behr, M.A. (2008) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. *J Bacteriol* **190**: 2479-2487.
- Umubyeyi, A.N., Shamputa, I.C., Rigouts, L., Dediste, A., Karita, E., Struelens, M.J., y Portaels, F. (2007) Molecular investigation of recurrent tuberculosis in patients from Rwanda. *Int J Tuberc Lung Dis* **11**: 860-867.
- Valcheva, V., Mokrousov, I., Rastogi, N., Narvskaya, O., y Markova, N. (2008) Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from different regions of Bulgaria. *J Clin Microbiol* **46**: 1014-1018.
- Valvatne, H., Syre, H., Kross, M., Stavrum, R., Ti, T., Phyu, S., y Grewal, H.M. (2009) Isoniazid and rifampicin resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Yangon, Myanmar: implications for rapid molecular testing. *J Antimicrob Chemother* **64**: 694-701.
- van Belkum A., Scherer, S., van Alphen, L., y Verbrugh, H. (1998) Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 275-293.

- van Deutekom, H., Supply, P., de Haas, P.E., Willery, E., Hoijs, S.P., Locht, C. y col. (2005) Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol* **43**: 4473-4479.
- van Ham, S.M., van Alphen, L., Mooi, F.R., y van Putten, J.P. (1993) Phase variation of *H. influenzae* fimbriae: transcriptional control of two divergent genes through a variable combined promoter region. *Cell* **73**: 1187-1196.
- van Ingen, J., Al-Hajj, S.A., Boeree, M., Al-Rabiah, F., Enaimi, M., de Zwaan, R. y col. (2009) *Mycobacterium rijadense* sp. nov., a non-tuberculous species identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex by a commercial line-probe assay. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 1049-1053.
- van Ingen, J., Boeree, M.J., de Lange, W.C., de Haas, P.E., van der Zanden, A.G., Mijs, W. y col. (2009) *Mycobacterium noviomagense* sp. nov.; clinical relevance evaluated in 17 patients. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 845-849.
- van Ingen, J., Lindeboom, J.A., Hartwig, N.G., de Zwaan, R., Tortoli, E., Dekhuijzen, P.N. y col. (2009) *Mycobacterium mantanii* sp. nov., a pathogenic, slowly growing, scotochromogenic species. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 2782-2787.
- Vansnick, E., De Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L., y Portaels, F. (2004) Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* **100**: 197-204.
- Vary, P.H., Andersen, P.R., Green, E., Hermon-Taylor, J., y McFadden, J.J. (1990) Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J Clin Microbiol* **28**: 933-937.
- Verna, A.E., García-Pariente, C., Muñoz, M., Moreno, O., García-Marin, J.F., Romano, M.I. y col. (2007) Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Zoonoses Public Health* **54**: 243-252.
- Viana-Niero, C., Gutierrez, C., Sola, C., Filliol, I., Boulahbal, F., Vincent, V., y Rastogi, N. (2001) Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of tandem DNA repeats. *J Clin Microbiol* **39**: 57-65.
- Vicenzoni, G., Filippi, L., Dolci, P., Corro, M., Job, L., Robbi, C. y col. (1999) Prevalenza de *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine macellate in provincia di Verona. *Atti della Società Italiana di Buiatria* **31**: 277-281.
- Viske, D., Larsson, B., Engvall, A., y Bölske, G. (1996) Paratuberculosis in Sweden. Libro de resúmenes del 5º Coloquio Internacional de Paratuberculosis. 143-146.
- Von Reyn, C.F., Maslow, J.N., Barber, T.W., Falkinham, J.O., III, y Arbeit, R.D. (1994) Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet* **343**: 1137-1141.
- Von Reyn, C.F., Arbeit, R.D., Horsburgh, C.R., Ristola, M.A., Waddell, R.D., Tvaroha, S.M. y col. (2002) Sources of disseminated *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *J Infect* **44**: 166-170.
- Vuorio, R., Andersson, M.A., Rainey, F.A., Kroppenstedt, R.M., Kampfer, P., Busse, H.J. y col. (1999) A new rapidly growing mycobacterial species, *Mycobacterium murale* sp. nov., isolated from the indoor walls of a children's day care centre. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 1**: 25-35.
- Wada, T., Maeda, S., Hase, A., y Kobayashi, K. (2007) Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Med Microbiol* **56**: 1052-1057.
- Wada, T., y Iwamoto, T. (2009) Allelic diversity of variable number of tandem repeats provides phylogenetic clues regarding the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family. *Infect Genet Evol* **9**: 921-926.
- Warren, R.M., Victor, T.C., Streicher, E.M., Richardson, M., van der Spuy, G.D., Johnson, R. y col. (2004) Clonal expansion of a globally disseminated lineage of *Mycobacterium tuberculosis* with low IS6110 copy numbers. *J Clin Microbiol* **42**: 5774-5782.

- Wayne, L.G. (1966) Classification and identification of mycobacteria. 3. Species within group 3. *Am Rev Respir Dis* **93**: 919-928.
- Wayne, L.G., y Diaz, G.A. (1986) A double staining method for differentiating between two classes of mycobacterial catalase in polyacrylamide electrophoresis gels. *Anal Biochem* **157**: 89-92.
- Wayne, L.G., Good, R.C., Tsang, A., Butler, R., Dawson, D., Groothuis, D. y col. (1993) Serovar determination and molecular taxonomic correlation in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*: a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 482-489.
- Weiss, D.J., Evanson, O.A., Deng, M., y Abrahamsen, M.S. (2004) Gene expression and antimicrobial activity of bovine macrophages in response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol* **41**: 326-337.
- Weiss, D.J., Evanson, O.A., Deng, M., y Abrahamsen, M.S. (2004) Sequential patterns of gene expression by bovine monocyte-derived macrophages associated with ingestion of mycobacterial organisms. *Microb Pathog* **37**: 215-224.
- Weiszfeiler, G., Karasseva, V., y Karczag, E. (1971) A new mycobacterium species: *Mycobacterium asiaticum* n. sp. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* **18**: 247-252.
- Weng, X.M., Wen, Y., Tian, X.J., Wang, H.B., Tan, X.J., y Li, H.Y. (2006) Preliminary study on the genotyping of *Mycobacterium leprae* on 50 isolates from China. *Zhonghua Lin Xing Bing Xue Za Zhi* **27**: 402-405.
- Whipple, D., Kapke, P., y Vary, C. (1990) Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* **28**: 2561-2564.
- Whipps, C.M., Butler, W.R., Pourahmad, F., Watral, V.G., y Kent, M.L. (2007) Molecular systematics support the revival of *Mycobacterium salmoniphilum* (ex Ross 1960) sp. nov., nom. rev., a species closely related to *Mycobacterium chelonae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 2525-2531.
- Whitlock, R.H., y Buergelt, C. (1996) Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **12**: 345-356.
- Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., y van Tiem, J. (2000) ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol* **77**: 387-398.
- Whittington, R., Marsh, I., Choy, E., y Cousins, D. (1998) Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol Cell Probes* **12**: 349-358.
- Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall, D.J., y Fraser, C.A. (1999) Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J Clin Microbiol* **37**: 1077-1083.
- Whittington, R.J., Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., y Marsh, I. (2000) Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J Clin Microbiol* **38**: 3240-3248.
- Whittington, R.J., Lloyd, J.B., y Reddacliff, L.A. (2001) Recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from nematode larvae cultured from the faeces of sheep with Johne's disease. *Vet Microbiol* **81**: 273-279.
- Whittington, R.J., Marsh, I.B., y Whitlock, R.H. (2001) Typing of IS1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Mol Cell Probes* **15**: 139-145.
- Whittington, R.J., Taragel, C.A., Ottaway, S., Marsh, I., Seaman, J., y Fridriksdottir, V. (2001) Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp.

paratuberculosis in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet Microbiol* **79**: 311-322.

Willemsen, P.T.J., Bakker, D., y van Zijderveld, F.G. (1999) An error in the reported IS900 nucleotide sequence affects the proposed expression of ORF2 (*bed*) and the detection of *M.paratuberculosis* using the polymerase chain reaction. Libro de resúmenes del 6° Coloquio Internacional de Paratuberculosis. 466-471.

Williams-Bouyer, N., Yorke, R., Lee, H.I., y Woods, G.L. (2000) Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* **38**: 4167-4170.

Williamson, H.R., Benbow, M.E., Nguyen, K.D., Beachboard, D.C., Kimbirauskas, R.K., McIntosh, M.D. y col. (2008) Distribution of *Mycobacterium ulcerans* in Buruli Ulcer Endemic and Non-Endemic Aquatic Sites in Ghana. *PLoS Negl Trop Dis* **2**: e205.

Willumsen, P., Karlson, U., Stackebrandt, E., y Kroppenstedt, R.M. (2001) *Mycobacterium frederiksbergense* sp. nov., a novel polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* species. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1715-1722.

Wilson, R.W., Steingrube, V.A., Bottger, E.C., Springer, B., Brown-Elliott, B.A., Vincent, V. y col. (2001) *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1751-1764.

Windsor, R.S., Durrant, D.S., y Burn, K.J. (1984) Avian tuberculosis in pigs: *Mycobacterium intracellulare* infection in a breeding herd. *Vet Rec* **114**: 497-500.

Wood, P.R., Rothel, J.S., McWaters, P.G., y Jones, S.L. (1990) Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma-interferon. *Vet Immunol Immunopathol* **25**: 37-46.

Wu, C.W., Glasner, J., Collins, M., Naser, S., y Talaat, A.M. (2006) Whole-genome plasticity among *Mycobacterium avium* subspecies: insights from comparative genomic hybridizations. *J Bacteriol* **188**: 711-723.

Wu, C.W., Schmoller, S.K., Shin, S.J., y Talaat, A.M. (2007) Defining the stressome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in vitro and in naturally infected cows. *J Bacteriol* **189**: 7877-7886.

Wu, C.W., Schmoller, S.K., Bannantine, J.P., Eckstein, T.M., Inamine, J.M., Livesey, M. y col. (2009) A novel cell wall lipopeptide is important for biofilm formation and pathogenicity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Microb Pathog* **46**: 222-230.

Yadav, D., Singh, S.V., Singh, A.V., Sevilla, I., Juste, R.A., Singh, P.K., y Sohal, J.S. (2008) Pathogenic 'Bison-type' *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genotype characterized from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) in North India. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **31**: 373-387.

Yakubu, D.E., Abadi, F.J., y Pennington, T.H. (1999) Molecular typing methods for *Neisseria meningitidis*. *J Med Microbiol* **48**: 1055-1064.

Yan, J.J., Jou, R., Ko, W.C., Wu, J.J., Yang, M.L., y Chen, H.M. (2005) The use of variable-number tandem-repeat mycobacterial interspersed repetitive unit typing to identify laboratory cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **52**: 21-28.

Yindeeyoungyeon, W., Likitvivatanavong, S., y Palittapongarnpim, P. (2009) Characterization of alpha-isopropylmalate synthases containing different copy numbers of tandem repeats in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Microbiol* **9**: 122.

Yokoyama, E., Kishida, K., y Ichinohe, S. (2007) Improved molecular epidemiological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains using multi-locus variable number of tandem repeats typing. *Jpn J Infect Dis* **60**: 235-236.

Yun, K.W., Song, E.J., Choi, G.E., Hwang, I.K., Lee, E.Y., y Chang, C.L. (2009) Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Korea by Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats. *Korean J Lab Med* **29**: 314-319.

Zhang, L., Chen, J., Shen, X., Gui, X., Mei, J., DeRiemer, K., y Gao, Q. (2008) Highly polymorphic variable-number tandem repeats loci for differentiating Beijing genotype strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Shanghai, China. *FEMS Microbiol Lett* **282**: 22-31.

Zozio, T., Allix, C., Gunal, S., Saribas, Z., Alp, A., Durmaz, R. y col. (2005) Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in two cities of Turkey: description of a new family of genotypes that is phylogeographically specific for Asia Minor. *BMC Microbiol* **5**: 44.

Zwiehner, J., Handschur, M., Michaelsen, A., Irez, S., Demel, M., Denner, E.B., y Haslberger, A.G. (2008) DGGE and real-time PCR analysis of lactic acid bacteria in bacterial communities of the phyllosphere of lettuce. *Mol Nutr Food Res* **52**: 614-623.

Anexo / Appendix

Lista de especies de micobacterias descritas

List of described mycobacteria

Nombre de micobacteria	Referencia bibliográfica	Cepa de referencia*
<i>Mycobacterium abscessus</i>	(Moore y Frerichs, 1953)	ATCC 19977
<i>Mycobacterium africanum</i>	(Castets y Sarrat, 1969)	ATCC 25420
<i>Mycobacterium agri</i>	(Tsukamura, 1981)	ATCC 27406
<i>Mycobacterium aichiense</i>	(Tsukamura y col. 1981)	ATCC 27280
<i>Mycobacterium alvei</i>	(Ausina y col. 1992)	ATCC 51304
<i>Mycobacterium aromaticivorans</i>	(Hennessee y col. 2009)	ATCC BAA-1378
<i>Mycobacterium arosiense</i>	(Bang y col. 2008)	ATCC BAA-1401
<i>Mycobacterium arupense</i>	(Cloud y col. 2006)	ATCC BAA-1242
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	(Weiszfeiler y col. 1971)	ATCC 25276
<i>Mycobacterium aubagnense</i>	(Adekambi y col. 2006)	Strain U8
<i>Mycobacterium aurum</i>	(Tsukamura y Tsukamura, 1966)	ATCC 23366
<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	(Tsukamura y col. 1983)	ATCC 33464
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	(Thorel y col. 1990)	ATCC 25291
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	(Thorel y col. 1990)	ATCC 19698
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	(Thorel y col. 1990)	ATCC 49884
<i>Mycobacterium boenickei</i>	(Schinsky y col. 2004)	ATCC 49935
<i>Mycobacterium bohemicum</i>	(Reischl y col. 1998)	Strain CIP 105808
<i>Mycobacterium bolletii</i>	(Adekambi y col. 2006)	Strain BD
<i>Mycobacterium botniense</i>	(Torkko y col. 2000)	ATCC 700701
<i>Mycobacterium bovis</i>	(Karlson y Lessel, 1970)	ATCC 19210
<i>Mycobacterium bouchedurbonense</i>	(Ben Salah y col. 2009)	Strain 4355387
<i>Mycobacterium branderi</i>	(Koukila-Kahkola y col. 1995)	ATCC51781
<i>Mycobacterium brisbanense</i>	(Schinsky y col. 2004)	ATCC 49938
<i>Mycobacterium brumae</i>	(Luquin y col. 1993)	ATCC 51384
<i>Mycobacterium canariense</i>	(Jimenez y col. 2004)	Strain 502329
<i>Mycobacterium caprae</i>	(Aranaz y col. 1999)	ATCC BAA-824
<i>Mycobacterium celatum</i>	(Butler y col. 1993)	ATCC 51131
<i>Mycobacterium chelonae</i>	(Bergey y col. 1923)	ATCC 35752
<i>Mycobacterium chimera</i>	(Tortoli y col. 2004)	Strain F1-01069
<i>Mycobacterium chitae</i>	(Tsukamura, 1967)	ATCC 19627
<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>	(Haggbloom y col. 1994)	ATCC 49826
<i>Mycobacterium chubuense</i>	(Tsukamura et al. 1981)	ATCC 27278
<i>Mycobacterium colombiense</i>	(Murcia y col. 2006)	Strain 10B
<i>Mycobacterium conceptionense</i>	(Adekambi y col. 2006)	Strain D16
<i>Mycobacterium confluentis</i>	(Kirschner y col. 1992)	ATCC 49920
<i>Mycobacterium conspicuum</i>	(Springer y col. 1995)	ATCC 49920
<i>Mycobacterium cookii</i>	(Kazda y col. 1990)	ATCC 49103
<i>Mycobacterium cosmeticum</i>	(Cooksey y col. 2004)	ATCC BAA-878
<i>Mycobacterium crocinum</i>	(Hennessee y col. 2009)	ATCC BAA-1373
<i>Mycobacterium diernhoferi</i>	(Bonicke y Juhasz, 1965)	ATCC19340
<i>Mycobacterium doricum</i>	(Tortoli y col. 2001)	Strain FI-13295
<i>Mycobacterium duvalii</i>	(Stanford y Gunthorpe, 1971)	ATCC 43910
<i>Mycobacterium elephantis</i>	(Shojaei y col. 2000)	Strain 484
<i>Mycobacterium fallax</i>	(Lévy-Frédault y col. 1983)	ATCC 35219
<i>Mycobacterium farcinogenes</i>	(Chamoiseau y col. 1973)	ATCC 35753
<i>Mycobacterium flavescens</i>	(Bojalil y col. 1962)	ATCC 14474

Nombre de micobacteria	Referencia bibliográfica	Cepa de referencia*
<i>Mycobacterium florentinum</i>	(Tortoli y col. 2005)	Strain FI-93171
<i>Mycobacterium fluoranthenorans</i>	(Hormish y col. 2004)	Strain FA4
<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	(Da Costa Cruz, 1938)	ATCC 6841
<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	(Tsukamura y col. 1986)	ATCC 35931
<i>Mycobacterium frederiksbergense</i>	(Willumsen y col. 2001)	Strain Fan9
<i>Mycobacterium gadium</i>	(Casal y Calero, 1974)	ATCC 27726
<i>Mycobacterium gastri</i>	(Wayne, 1966)	ATCC 15754
<i>Mycobacterium genavense</i>	(Bottger y col. 1993)	ATCC 51234
<i>Mycobacterium gilvum</i>	(Stanford y Gunthorpe, 1971)	ATCC 43909
<i>Mycobacterium goodii</i>	(Brown y col. 1999)	ATCC 700504
<i>Mycobacterium gordonae</i>	(Bojalil y col. 1962)	ATCC 14470
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	(Sompolinsky y col. 1978)	ATCC 29548
<i>Mycobacterium hassiacum</i>	(Schröder y col. 1997)	Strain 3849
<i>Mycobacterium heckeshornense</i>	(Roth y col. 2000)	Strain S369
<i>Mycobacterium heidelbergense</i>	(Haas y col. 1997)	ATCC 51253
<i>Mycobacterium hiberniae</i>	(Kazda y col. 1993)	ATCC 49874
<i>Mycobacterium hodleri</i>	(Kleespies y col. 1996)	Strain EM12
<i>Mycobacterium holsaticum</i>	(Ritcher y col. 2002)	Strain 1406
<i>Mycobacterium houstonense</i>	(Schinsky y col. 2004)	ATCC 49403
<i>Mycobacterium immunogenum</i>	(Wilson y col. 2001)	ATCC 700505
<i>Mycobacterium insubricum</i>	(Tortoli y col. 2009)	Strain FI-06250
<i>Mycobacterium interjectum</i>	(Springer y col. 1993)	ATCC 51457
<i>Mycobacterium intermedium</i>	(Meier y col. 1993)	ATCC 51848
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	(Cuttino y McCabe, 1949)	ATCC 13950
<i>Mycobacterium kasasii</i>	(Hauduroy, 1955)	ATCC 12478
<i>Mycobacterium komossense</i>	(Kazda y Müller, 1979)	ATCC 33013
<i>Mycobacterium kubicae</i>	(Floyd y col. 2000)	ATCC 700732
<i>Mycobacterium kumamotoense</i>	(Masaki y col. 2006)	Strain CST 7247
<i>Mycobacterium kyorinense</i>	(Okazaki y col. 2009)	Strain KUM 060204
<i>Mycobacterium lacus</i>	(Turenne y col. 2002)	ATCC BAA-323
<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	(Springer y col. 1996)	ATCC 51985
<i>Mycobacterium leprae</i>	(Lehmann y Neumann, 1896)	No cultivable
<i>Mycobacterium lepraemurium</i>	(Marchoux y Sorel 1912)	No especificada
<i>Mycobacterium llatzerense</i>	(Gomila y col. 2008)	Strain MG13
<i>Mycobacterium madagascariense</i>	(Kazda y col. 1992)	ATCC 49865
<i>Mycobacterium mageritense</i>	(Domenech y col. 1997)	ATCC 700351
<i>Mycobacterium malmoense</i>	(Schröder y Juhlin, 1977)	ATCC 29571
<i>Mycobacterium manteni</i>	(van Ingen y col. 2009)	Strain 04-1474
<i>Mycobacterium marinum</i>	(Aronson, 1926)	ATCC 927
<i>Mycobacterium marselliense</i>	(Ben Salah y col. 2009)	Strain 5356591
<i>Mycobacterium massiliense</i>	(Adekambi y col. 2006)	Strain CCUG 48898
<i>Mycobacterium microti</i>	(Reed, 1957)	ATCC 19422
<i>Mycobacterium monacense</i>	(Reischl y col. 2006)	Strain B9-21-178
<i>Mycobacterium montefiorensis</i>	(Levi y col. 2003)	ATCC BAA-256
<i>Mycobacterium morioakaense</i>	(Tsukamura y col. 1986)	ATCC 43059
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	(Springer y col. 1995)	ATCC 49650
<i>Mycobacterium murale</i>	(Vuorio y col. 1999)	Strain MA112/96
<i>Mycobacterium nebraskense</i>	(Mohamed y col. 2004)	ATCC BAA-837
<i>Mycobacterium neoaurum</i>	(Tsukamura, 1972)	ATCC 25795
<i>Mycobacterium neworleansense</i>	(Schinsky y col. 2004)	ATCC 49404
<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	(Tsukamura, 1965)	ATCC 19530
<i>Mycobacterium noviomagense</i>	(van Ingen y col. 2009)	Strain NLA000500338
<i>Mycobacterium novocastrense</i>	(Shojaei y col. 1997)	Strain 73
<i>Mycobacterium obuense</i>	(Tsukamura y Mizuno, 1971)	ATCC 27023
<i>Mycobacterium pallens</i>	(Hennessee y col. 2009)	ATCC BAA-1372
<i>Mycobacterium palustre</i>	(Torkko y col. 2002)	ATCC BAA-377
<i>Mycobacterium parafortuitum</i>	(Tsukamura y col. 1966)	ATCC 19686
<i>Mycobacterium parascrofulaceum</i>	(Turenne y col. 2004)	ATCC BAA-614
<i>Mycobacterium parnense</i>	(Fanti y col. 2004)	MUP 1182

Nombre de micobacteria	Referencia bibliográfica	Cepa de referencia*
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	(Kusunoki y col. 1992)	ATCC 14467
<i>Mycobacterium phlei</i>	(Lehmann y Neumann, 1899)	ATCC 11758
<i>Mycobacterium phocaicum</i>	(Adekambi y col. 2006)	Strain N4
<i>Mycobacterium pinnipedii</i>	(Cousins y col. 2003)	ATCC BAA-688
<i>Mycobacterium porcinum</i>	(Tsukamura y col. 1983)	ATCC 33776
<i>Mycobacterium poriferarum</i>	(Padgett y Moshier, 1987)	ATCC 35087
<i>Mycobacterium pseudoshottsii</i>	(Rhodes y col. 2005)	ATCC BAA-883
<i>Mycobacterium psychrotolerans</i>	(Trujillo y col. 2004)	ATCC BAA-883
<i>Mycobacterium pulveris</i>	(Tsukamura y col. 1983)	Strain WA101
<i>Mycobacterium pyrenivorans</i>	(Derz y col. 2004)	Strain 17A3
<i>Mycobacterium rhodesiae</i>	(Tsukamura y col. 1971)	ATCC 27024
<i>Mycobacterium riyadhense</i>	(van Ingen y col. 2009)	Strain NLA000201958
<i>Mycobacterium rufum</i>	(Hennessee y col. 2009)	ATCC BAA-1377
<i>Mycobacterium rutilum</i>	(Hennessee y col. 2009)	ATCC BAA-1375
<i>Mycobacterium salmoniphilum</i>	(Whipps y col. 2007)	ATCC 13758
<i>Mycobacterium saskatchewanense</i>	(Turenne y col. 2004)	ATCC BAA-544
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	(Masson y Prissick, 1956)	ATCC 19981
<i>Mycobacterium senegalense</i>	(Chamoiseau, 1973)	ATCC 35796
<i>Mycobacterium senuense</i>	(Mun y col. 2008)	Strain 05-832
<i>Mycobacterium seoulense</i>	(Mun y col. 2007)	Strain 03-19
<i>Mycobacterium septicum</i>	(Schinsky y col. 2000)	ATCC 700731
<i>Mycobacterium setense</i>	(Lamy y col. 2008)	Strain ABO-M06
<i>Mycobacterium shimoidei</i>	(Tsukamura, 1982)	ATCC 27962
<i>Mycobacterium shottsii</i>	(Rhodes y col. 2003)	ATCC 700981
<i>Mycobacterium simiae</i>	(Karassova y col. 1965)	ATCC 25275
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	(Lehmann y Neumann, 1899)	ATCC 19420
<i>Mycobacterium sphagni</i>	(Kazda, 1980)	ATCC 33027
<i>Mycobacterium stomatopneumoniae</i>	(Pourahmad y col. 2008)	Strain T11
<i>Mycobacterium szulgai</i>	(Marks y col. 1972)	ATCC 35799
<i>Mycobacterium terrae</i>	(Wayne, 1966)	ATCC 15755
<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	(Bojalil y col. 1962)	ATCC 19527
<i>Mycobacterium timonense</i>	(Ben Salah y col. 2009)	Strain 5351974
<i>Mycobacterium tokaiense</i>	(Tsukamura y col. 1981)	ATCC 27282
<i>Mycobacterium triplex</i>	(Floyd y col. 1996)	ATCC 700071
<i>Mycobacterium triviale</i>	(Kubica y col. 1970)	ATCC 23292
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(Lehmann y Neumann, 1896)	ATCC 27294
<i>Mycobacterium tusciae</i>	(Tortoli y col. 1999)	Strain FI-25796
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	(MacCallum y col. 1950)	ATCC 19423
<i>Mycobacterium vaccae</i>	(Bonnicke y Juhasz, 1964)	ATCC 15483
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	(Khan y col. 2002)	Strain PYR-1
<i>Mycobacterium wolinskyi</i>	(Brown y col. 1999)	ATCC 700010
<i>Mycobacterium xenopi</i>	(Schwabacher, 1959)	ATCC 19250

* En la tabla se reflejan los números de acceso de la colección americana de cultivos tipo (*American Type Cell Culture Collection*, ATCC) de las cepas de referencia en el caso de que éstas estén disponibles dentro de esta colección. En caso contrario, se refleja el nombre de la cepa de referencia descrita originariamente en la publicación.

Lista de abreviaturas

List of abbreviations

A: adenina/adenine

AFLP: análisis de los polimorfismos de fragmentos largos amplificados /amplified fragment length polymorphism

AG: arabinogalactano /arabinogalactan

AlpC: gen peroxiredoxina / peroxiredoxine gene

ATCC: colección española de cultivos tipo / American type culture collection

BSA: albúmina sérica bovina / bovine serum albumin

(k) bp: (kilo) pares de bases / base pair

Bomac: línea celular de macrófagos bovinos / bovine transformed macrophage cell line

C: citosina/cytosine

CACO-2: adenocarcinoma de colon de hombre caucásico / human caucasian colon adenocarcinoma

CFU: unidades formadoras de colonias / colony forming unit

DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante / Denaturing gradient gel electrophoresis

DMC-PCR: PCR descrita por D.M Collins y col. 2002 / PCR described by Collins et al. 2002

DMSO: sulfóxido de dimetilo / dimethyl sulfoxide

DNA: ácido deoxirribonucleico / deoxyribonucleic acid

DnaJ: chaperona / chaperone

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético / etilendiaminotetraacetic acid

G: guanina / guanine

- Gyr*: gen de la girasa / gyrase gene
- HEY (M): (medio) Herrold's con yema de huevo / Herrold's egg yolk (medium)
- HGDI: índice de discriminación de Hunter y Gaston / Hunter and Gaston discriminative index
- HGC: hibridación genómica comparada / genomic hybridization comparison
- HPC: cloruro de hexadecyl piridinio / hexadecyl pyridinium chloride
- HRM: análisis de curvas de disociación de alta resolución / high resolution melt analysis
- Hsp*: proteína de estrés al calor / heat shock protein
- INDEL: inserción-delección / insertion-deletion
- Inb-A*: proteína reductasa transportadora de enoil-acil / enoyl-acyl carrier protein reductase
- IS: secuencia de inserción / insertion sequence
- JD: enfermedad de Johne / Johne's disease
- KatG*: gen catalasa-oxidasa / catalase-oxidase gene
- LAM: lipoarabinomanano / Lipoarabinomanan
- LJ: Löwenstein-Jensen
- LSP: fragmentos polimórficos largos / large sequence polymorphisms
- MA: ácidos micólicos / mycolic acids
- MAC: complejo *Mycobacterium avium* / *Mycobacterium avium* complex
- Maa*: *Mycobacterium avium* subespecie *avium* / *Mycobacterium avium* subspecies *avium*
- Mab*: *Mycobacterium avium* subespecie *hominissuis* / *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*
- MAI: *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*
- Map*: *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* / *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*
- MAPAC array: microarray de oligonucleótidos de 60-pb combinado con los genomas de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* subespecie *hominissuis* / 60-mer oligonucleotide combined microarray with the genomes of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*
- mbtG*: gen monooxigenasa / monooxygenase gene
- Mce: genes de entrada a células mamíferas / mammalian cell entry genes
- MES: 2-(N-morfolina) ácido etanosulfónico / 2-(N-morpholine) ethanesulfonic acid
- MIRU: unidades repetitivas intergénicas dispersas de micobacterias / mycobacterial interspersed repetitive units
- MLB: buffer de lisis de micobacterias / mycobacterial lysis buffer

MOCL-4:	línea celular derivada de monocitos ovinos / ovine-monocyte derived cell line
<i>Mur-I</i> :	gen glutamato racemasa / glutamate racemase gene
ORF:	marco de lectura abierto / open reading frame
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa / polymerase chain reaction
PFGE:	electrophoresis en campo pulsado / pulsed-field gel electrophoresis
PE:	Prolina-Ácido glutámico / Proline-Glutamic acid
PI:	posterior a la infección / post-infection
PPE:	Prolina-Prolina-Ácido Glutámico / Proline-Proline- Glutamic acid
<i>OxyR</i> :	gen responsable del estrés oxidativo / oxidative stress gene
<i>PhoP-PhoR</i> :	sistema regulador de dos componentes / two-component regulatory system
Q- PCR:	PCR cuantitativa / quantitative real time-PCR
RDA:	análisis de las diferencias representacionales / representational differential analysis
REA:	análisis de restricción enzimática / restriction enzymatic analysis
rRNA16 S:	ARN ribosómico subunidad 16S / ribosomal RNA, 16S subunit
RFLP:	restricción de fragmentos polimórficos largos / restriction fragment length polymorphism
RNA:	ácido ribonucleico / ribonucleic acid
SDS:	dodecil sulfato de sodio / sodium dodecyl sulphate
SNP:	polimorfismo de nucleótido único / single nucleotide polymorphism
<i>Sod-A</i> :	gen superóxido dismutasa / superoxide-dismutase gene
SSC:	citrato de sodio-citrato de cloro / sodium citrate-sodium chloride
SSR:	repeticiones de secuencia corta / short sequence repeats
T:	timina / thymine
THP-1:	línea celular monocítica de leucemia aguda de hombre / human acute monocytic leukemia cell line
<i>ThrB</i> :	gen de biosíntesis de la treonina / threonine biosynthesis gene
T _m :	temperatura de disociación / melting temperature
<i>Tpx</i> :	gen tiol-peroxidasa / thiol-peroxidase gene
TR:	repeticiones en tándem / tandem repeats
vGI:	islas genómicas variables / variable genomic islands
VNTR:	repeticiones en tándem de número variable / variable number tandem repeats

Lista de figuras

Figura 1	Arbol filogénico de las micobacterias de crecimiento rápido en función del gen ARNr 16S	8
Figura 2	Arbol filogénico de las micobacterias de crecimiento lento en función del gen ARNr 16S	9
Figura 3	Pared celular de micobacterias	11
Figura 4	Genes responsables de la producción de micobactina en <i>M. a. paratuberculosis</i> , <i>M. avium</i> y <i>M. tuberculosis</i> respectivamente	17
Figura 5	Operones <i>mce</i> distribuidos en el genoma de la cepa de referencia de <i>M. a. paratuberculosis</i> K-10	19
Figura 6	Representación lineal de las regiones repetitivas y únicas en el genoma de <i>M. a. paratuberculosis</i> K-10	25
Figura 7	Esquema de los 14 de loci en los que se inserta IS900 en el genoma de <i>M. a. paratuberculosis</i>	27
Figura 8	Perfil de restricción enzimática de la IS1311	28
Figura 9	Comparación de las secuencias IS1311 de <i>M. a. paratuberculosis</i> “Tipo B” con las de otros aislados de <i>M. a. paratuberculosis</i>	29
Figura 10	Distribución de motivos A y B en cada uno de los MIRU loci	36
Figura 11	Alineamiento de los motivos A y B de los 18 MIRU loci descritos en los genomas de <i>M. a. paratuberculosis</i> y <i>M. a. avium</i>	38
Figura 12	Perfiles de RFLP obtenidos con la enzima <i>Bst</i> EII e hibridación con la IS1311 para los aislados de <i>M. a. paratuberculosis</i>	41
Figura 13	Perfiles de RFLP obtenidos con la enzima <i>Bst</i> EII	42

Figura 14	Dendrograma de los 16 perfiles genómicos obtenidos con PFGE de los aislados de <i>M. a. paratuberculosis</i> pigmentados y no pigmentados	46
Figura 15	Perfiles de PFGE obtenidos con las enzimas <i>Sna</i> BI y <i>Spe</i> I	47
Figura 16	Gel de DGGE resultado de la amplificación del gen MAP1506 en los <i>M. a. paratuberculosis</i> I, II y III	51
Figura 17	Cambios en la fluorescencia frente al incremento de la temperatura tras el cambio de estado conformacional del ADN	54
Figura 18	Análisis de las curvas de disociación de alta resolución en función del incremento de temperatura para dos variantes de un mismo gen	54
Figura 19	Imagen obtenida con el programa GeneSpring 7.3.1 que representa los LSP y genes noveles específicos para las cepas tipo III	57
Figura 20	Rutas de transmisión y de infección del complejo <i>Mycobacterium avium</i>	60
Figura 21	Apariencia macroscópica de las colonias de <i>M. a. paratuberculosis</i> en el medio Middlebrook 7H11 con micobactina	66
Figura 22	Lesión focal en vacas y cabras	71
Figura 23	Lesiones multifocales en íleon	72
Figura 24	Yeyuno con infiltrado inflamatorio	73
Figura 25	Íleo con infiltrado inflamatorio	73
Figura 26	Íleo con atrofia de las vellosidades intestinales y separación glandular debido a un infiltrado inflamatorio	74
Figura 27	Tinción de Ziehl-Neelsen que muestra bacilos de <i>M. a. paratuberculosis</i> en un tejido de paciente de Crohn	82

List of figures

Figure 1	Phylogenetic tree of rapid growing mycobacteria based on 16S rRNA gene	8
Figure 2	Phylogenetic tree of slow growing mycobacteria based on 16S rRNA gene	9
Figure 3	Mycobacterial cell wall	11
Figure 4	Genes responsible of mycobactin production in <i>M. a. paratuberculosis</i> , <i>M. avium</i> and <i>M. tuberculosis</i>	17
Figure 5	Distribution of <i>mce</i> operons along the genome of the reference strain <i>M. a. paratuberculosis</i> K-10	19
Figure 6	Lineal representation of unique and repetitive regions of the <i>M. a. paratuberculosis</i> K-10 genome	25
Figure 7	Diagram of the 14 loci where IS900 inserts in the <i>M. a. paratuberculosis</i> genome	27
Figure 8	Enzymatic restriction profile of IS1311	28
Figure 9	IS1311 sequence comparison of <i>M. a. paratuberculosis</i> “Type B” and other <i>M. a. paratuberculosis</i> isolates	29
Figure 10	Distribution of motifs A and B of each MIRU loci MIRU	36
Figure 11	Alignment of motifs A and B of the 18 MIRU loci described in the genomes of <i>M. a. paratuberculosis</i> and <i>M. a. avium</i>	38
Figure 12	RFLP profiles obtained with <i>Bst</i> EII and hybridization with IS1311 for <i>M. a. paratuberculosis</i> isolates	41
Figure 13	RFLP profiles obtained with <i>Bst</i> EII for C, S and I strains	42

Figure 14	Dendrogram representing the 16 genomic profiles obtained with PFGE for pigmented and non-pigmented <i>M. a. paratuberculosis</i> isolates	46
Figure 15	PFGE profiles obtained with the restriction enzymes <i>Sna</i> BI y <i>Spe</i> I	47
Figure 16	DGGE gel representing the amplification of gene MAP1506 of <i>M. a. paratuberculosis</i> types I, II and III	51
Figure 17	Fluorescence changes versus temperature increments due to changes in the DNA conformation	54
Figure 18	High resolution melt analysis due to temperature increments for two different gene variants	54
Figure 19	Image obtained with GeneSpring 7.3.1 software that represents the novel LSP and genes specific for type III strains	57
Figure 20	Transmission and infection routes of the members of the <i>Mycobacterium avium</i> complex (MAC)	60
Figure 21	Macroscopic appearance of <i>M. a. paratuberculosis</i> colonies in Middlebrook 7H11 with mycobactin	66
Figure 22	Focal lesion in cattle and in goats	71
Figure 23	Multifocal lesion in ileum	72
Figure 24	Jejunum with inflammatory infiltrate	73
Figure 25	Ileum with inflammatory infiltrate	73
Figure 26	Ileum with atrophic intestinal villi and glandular separation due to inflammatory infiltration	74
Figure 27	Ziehl-Neelsen staining that shows <i>M. a. paratuberculosis</i> bacilli in a Crohn's disease patient tissue	82

Lista de tablas

Tabla 1	Clasificación de las micobacterias en función de la producción de pigmento	6
Tabla 2	Fuentes de aislamiento de los miembros del complejo <i>Mycobacterium avium</i>	14
Tabla 3	Características del genoma de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> y otras micobacterias	17
Tabla 4	Lista de MIRU-VNTR sinónimos descritos en la literatura empleados en la caracterización molecular de los miembros de MAC	34
Tabla 5	Clasificación de las cepas de <i>M. a. paratuberculosis</i> en función de las técnicas de caracterización molecular más tradicionales	48
Tabla 6	Secuencias del gen <i>hsp65</i> de los miembros del complejo <i>Mycobacterium avium</i>	53
Tabla 7	Empleo de microarray en <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	56
Tabla 8	Prevalencias individuales de paratuberculosis en Europa en ganado vacuno	63
Tabla 9	Prevalencias individuales de paratuberculosis en Europa en ovejas y cabras	63
Tabla 10	Detección de las pruebas diagnósticas en función de la fase clínica de la enfermedad	64
Tabla 11	Rasgos clínicos de la enfermedad de Crohn y la enfermedad de Johne	80
Tabla 12	Rasgos patológicos de la enfermedad de Crohn y la enfermedad de Johne	81

List of tables

Table 1	Classification of mycobacteria based on pigment production	6
Table 2	Sources of isolation of the members of <i>Mycobacterium avium</i> complex	14
Table 3	Characteristics of the genome of <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> and other mycobacteria	17
Table 4	List of described MIRU-VNTR that are synonyms and are used in the molecular characterization of MAC members	34
Table 5	Classification of <i>M. a. paratuberculosis</i> strains based on traditional molecular techniques	48
Table 6	Sequences of the gene <i>hsp65</i> for the members of the <i>Mycobacterium avium</i> complex	53
Table 7	Use of microarray in <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>	56
Table 8	Individual prevalences of paratuberculosis in cattle in Europe	63
Table 9	Individual prevalences of paratuberculosis in small ruminants in Europe	63
Table 10	Detection of diagnostic tests based on the clinical status of the disease	64
Table 11	Clinical features of Crohn and Johne's disease	80
Table 12	Pathological features of Crohn and Johne's disease	81

Lista de publicaciones

Publication list

Castellanos E., Aranaz A., Romero B., de Juan L., Álvarez J., Bezos J., Rodríguez S., Stevenson K., Mateos A., Domínguez L. Polymorphisms in *gyrA* y *gyrB* genes among *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Types I, II y III. Journal of Clinical Microbiology. 2007. 45 (10):3439-42.

Castellanos E., Álvarez J., Aranaz A., Romero B., de Juan L., Bezos J., Rodríguez S., Stevenson K., Mateos M., Domínguez L. Use of Single Nucleotide Polymorphisms in *inhA* gene to classify *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* into Types I, II y III. 9th International Colloquium on Paratuberculosis. Libro de resúmenes del 9th Coloquio Internacional de Paratuberculosis. 2008. p. 6-8. In S. S. Nielsen (ed.).

de Juan, L., **Castellanos, E.**, Aranaz, A. ParaTBtools: Herramientas para el diagnóstico de la paratuberculosis. Revista Albéitar. 2009. 124: 8-11.

Castellanos E., Aranaz A., de Juan L., Álvarez A., Rodríguez S., Romero B., Bezos J., Stevenson K., Mateos A., Domínguez L. Single nucleotide polymorphisms in the IS900 sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* are strain type-specific. Journal of Clinical Microbiology. 2009. 47 (7): 2260-2264.

Castellanos E., Romero B., Rodríguez S., de Juan L., Bezos J., Mateos A., Domínguez L., Aranaz A. Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Type II

y III isolates by a combination of MIRU-VNTR. Veterinary Microbiology. Aceptado. Enero, 2010.

Millán, J., Negré, N., **Castellanos E.**, de Juan, L., Mateos, A., Parpal, L., Aranaz, A. Avian mycobacteriosis in free-living raptors in Majorca Island, Spain. Avian Pathology. 2010. 39 (1): 1-6.

Castellanos E., Aranaz A., De Buck J. Rapid identification y differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* types y other *Mycobacterium avium* subspecies using real-time PCR y high resolution melt analysis of the MAP1506 gene. Journal of Clinical Microbiology. 2010. 48 (4): 1474-1477.

Castellanos E., Aranaz A., De Buck J. PCR amplification y high resolution melt curve analysis as a rapid diagnostic method to genotype members of the *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. Clinical Microbiology and Infection. Aceptado. Febrero, 2010.

Secuencias publicadas en el GenBank

Sequences published in GenBank

GenBank: EU029115.1

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* type I gyrase A (*gyrA*) gene, partial cds

LOCUS EU029115 2157 bp DNA linear BCT 05-OCT-2007
 DEFINITION *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I gyrase A (*gyrA*) gene, partial cds.
 ACCESSION EU029115
 VERSION EU029115.1 GI:154795734
 KEYWORDS .
 SOURCE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
 ORGANISM *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium; Mycobacterium *avium* complex (MAC).
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2157)
 AUTHORS Castellanos,E., Aranaz,A., Romero,B., de Juan,L., Alvarez,J., Bezos,J., Rodriguez,S., Stevenson,K., Mateos,A. and Dominguez,L.
 TITLE Polymorphisms in *gyrA* and *gyrB* genes among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III isolates
 JOURNAL J. Clin. Microbiol. 45 (10), 3439-3442 (2007)
 PUBMED 17670925
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2157)
 AUTHORS Castellanos,E., Aranaz,A., Romero,B., De Juan,L., Alvarez,J., Bezos,J., Rodriguez,S., Stevenson,K., Mateos,A. and Dominguez,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (10-JUL-2007) Animal Health, Complutense University of Madrid, Puerta De Hierro s/n, Madrid 28040, Spain
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..2157
 /organism="Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /sub_species="paratuberculosis"
 /db_xref="taxon:1770"
 /PCR_primers="fwd_seq: ccatgtacgactcgggtttc, rev_seq: ggattggtcctcgatattgg"
 /PCR_primers="fwd_seq: ggagtcggttgaggtggaaga, rev_seq: ggtacaggtcgggtcttgggtg"
 /PCR_primers="fwd_seq: acgtcgtcgtcaccatcac, rev_seq: cctcaccagattcatcagc"
 /note="type: I"
 gene <1..>2157
 /gene="gyrA"
 CDS <1..>2157
 /gene="gyrA"
 /codon_start=2
 /transl_table=11
 /product="gyrase A"
 /protein_id="ABS86855.1"
 /db_xref="GI:154795735"

/translation="PDRSHAKSARSVAETMGNYHPHGDA SIYDTLVRMAQPWSLRYPL

VDGQGNFGSPGNDPPAAMRYTEARLTPLAMEMLREIDEETVDFIPNYDGRVQEPTVLP
SRFPNLLANGSGGIAVGMATNIPPHNLGELAEAVFWALDNYEADDEEATLAAMVERVK
PDFPTSGLIVGTQGIADAYKTGRGSIRMRGVVEVEEDSRGRTSLVITELPYQVNHDF
ITSIKQVRDGLAGISNIEDQSSDRVGLRIVIELKRDAVAKVVLNNLYKHTQLQTSF
GANMLAIVDGVPTLRLDQLIRHYVDHQLDVIVRRTTYRLRKANERAHILRGLVKALD
ALDEVIALIRASETVDIARQGLIELLDIDEIQAQAILDMQLRRLAALERQRIIDDLAK
IEAEIADLEDILAKPERQRGIVRDELAIEVEKHGDARRTRIVAADGDVSDEDIARED
XXXXXXXXXXXXXXXXXXYRSQKRGKGVGQAGLQDDIVRHFFVCSTHDWILFFTQ
GRVYRAKAYELPEASRTARGQHVANLLAFQPEERIAQVIQIRSYEDAPYLVLATRNL
VKKTKLTDFDSNRSGGIVAINLRDNDELVGAVLCSAEDDLLLSANGQSIRFSATDEA
LRPMGRATSGVQGMRFNADDYLLSLNVVREGTYLLVATSGGYAKRTAIEEYPVQGRGG
KGVLTVMYDRRRGRVLGALIVDEDESELYAITSGGGV"

ORIGIN

1	cccggaccgc	agccacgcc	agtcggcgcg	gtcggtcgcc	gagacgatgg	gcaactacca
61	cccgcacggc	gacgcctcga	tctacgacac	cctgggtcgg	atggcccagc	cgtggtcgct
121	gcgctaccgc	ttggtcgacg	ggcagggcaa	ctttggttcg	ccgggcaacg	acccgcccgc
181	cgcgatgcgg	tacaccgagg	cgcggtcgac	cccgttgccc	atggagatgc	tgcgcgaaat
241	cgacgaggag	acagtcgatt	tcattcccaa	ctacgacggc	cggttgcaag	agccgacggt
301	gctgcccagc	cggttcccca	acctgctggc	caacgggtcg	gggggcatcg	cggtcggcat
361	ggccacgaac	atcccgcggc	acaacctcgg	cgagctcgcc	gaggcggtgt	tctgggcgct
421	ggacaattac	gaggccgacg	aagaggccac	cctggccgcc	gtgatggaac	gggtgaaagg
481	acccgacttc	ccgacctccg	gcctgatcgt	cggcacgcag	ggcatcgccg	acgcctacaa
541	gaccggccgc	ggttccatcc	ggatgcgcgg	agtcgttgag	gtggaagagg	attcgcgcgg
601	ccgcacctcg	ctggatcatc	ccgagttgcc	gtatcaggtc	aaccacgaca	acttcatcac
661	ctcgatcgcc	aagcaggtgc	gcgacggcaa	gctggccggc	atctccaata	tcgaggacca
721	atccagcgac	cggttcgggc	tgcgcacgtc	catcgagctc	aagcgcgacg	ccgtcgccaa
781	ggtggtgctg	aacaacctct	acaagcacac	ccagctgcag	accagcttcg	gcgccaacat
841	gctggccatc	gtcgacgggg	tgccgcgcac	cctgcggctc	gaccagctga	tccgccacta
901	cgtcgaccac	caactcgacg	tcctcgctcg	gcgcaccacc	taccggttgc	gcaaggccaa
961	cgagcggggc	cacatcctgc	gcggctctgt	caaggcgctc	gatgcgctcg	acgaggtcat
1021	cgccctgatc	cgggcgctcg	aaaccgtcga	catcgcgcg	cagggcttga	tcgagctgct
1081	cgacatcgac	gagatccagg	cgcaggcgat	cctggacatg	cagctgcgcc	ggctggccgc
1141	gctggagcgg	cagcgcacat	tcgacgacct	ggccaagatc	gaggccgaga	tcgccgacct
1201	ggagagacat	ctggccaagc	cggaacggca	gcgcggcatc	gtgcgcgacg	agctcgccga
1261	gatcgctcga	aagcacggcg	acgcgcggcg	caccgcggatc	gtggccgccc	acggcgacgt
1321	tagcgacgag	gatctgatcg	ctcgcgagga	cnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn
1381	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnntgtaccg	cagccagaag	cgcggcggca	agggcgtgca
1441	ggcgccggcg	ctcaaacagg	acgacatcgt	gcggcacttc	ttcgtgtgct	cgacgcacga
1501	ctggatcctg	ttcttcacca	cccaggggcg	ggtctaccgc	gccaaaggcct	acgaactgcc
1561	cgaggcgctc	cgcaccgccc	gcggtcagca	cgtggccaac	ctgctggcgt	tccagcccga
1621	ggagaggatc	gctcaggtga	tccagatccg	gagctatgag	gacgctccct	acctgggtgct
1681	ggccaccgcg	aacggcctgg	tgaagaagac	caagctgacc	gacttcgact	cgaaccgctc
1741	ggcgggcatc	gtggcgatca	acctgcgcga	caacgacgaa	ctcgtggggc	cgggtgtgtg
1801	ctcgcccgag	gacgatctgc	tgctggtgtc	ggccaacggc	cagtccatcc	ggttctcggc
1861	gaccgacgag	gcgctgcgcc	cgatggggcg	cgccacctcc	ggtgtgcagg	gcgatcgctt
1921	caacgccgac	gactacctgc	tgctcgctcaa	cgtggtccgc	gagggcacct	acctgctggt
1981	ggcgacgtcc	ggcggttacg	ccaagcgac	cgcgatcgag	gagtatccgg	tcgaggcccg
2041	cgcgcgcaag	ggcggtgctga	ccgtgatgta	tgaccggcgc	cgtggcaggc	tgggtgggtgc
2101	gctgattgtg	gacgaggaca	gcgagctgta	cgcgatcacc	tccggcgggc	gtgtcat

GenBank: EU029113.1

***Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type III gyrase A (gyrA) gene, partial cds**

LOCUS EU029113 2178 bp DNA linear BCT 05-OCT-2007
 DEFINITION *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type III gyrase A (gyrA) gene, partial cds.
 ACCESSION EU029113
 VERSION EU029113.1 GI:154795730
 KEYWORDS .
 SOURCE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
 ORGANISM *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium; Mycobacterium avium complex (MAC).
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2178)
 AUTHORS Castellanos,E., Aranaz,A., Romero,B., de Juan,L., Alvarez,J., Bezos,J., Rodriguez,S., Stevenson,K., Mateos,A. and Dominguez,L.
 TITLE Polymorphisms in gyrA and gyrB genes among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III isolates
 JOURNAL J. Clin. Microbiol. 45 (10), 3439-3442 (2007)
 PUBMED 17670925
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2178)
 AUTHORS Castellanos,E., Aranaz,A., Romero,B., De Juan,L., Alvarez,J., Bezos,J., Rodriguez,S., Stevenson,K., Mateos,A. and Dominguez,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (10-JUL-2007) Animal Health, Complutense University of Madrid, Puerta De Hierro s/n, Madrid 28040, Spain
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..2178
 /organism="Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /sub_species="paratuberculosis"
 /db_xref="taxon:1770"
 /PCR_primers="fwd_seq: ccatgtacgactcgggtttc, rev_seq: ggattggctcctcgatatattgg"
 /PCR_primers="fwd_seq: ggagtcggttgaggtggaaga, rev_seq: ggtacaggtcgggtcttgggtg"
 /PCR_primers="fwd_seq: acgtcgtcgtcaccatcac, rev_seq: cctcaccagattcatcagc"
 /note="type: III"
 gene <1..>2178
 /gene="gyrA"
 CDS <1..>2178
 /gene="gyrA"
 /codon_start=2
 /transl_table=11
 /product="gyrase A"
 /protein_id="ABS86853.1"
 /db_xref="GI:154795731"

```
/translation="GFRPDRSHAKSARSVAETMGNYHPHGDASIYDTLVRMAQPWSLR
YPLVDGQGNFGSPGNDPPAAMRYTEARLTPLAMEMLREIDEETVDFIPNYDGRVQEPT
VLPSRFPNLLANGSGGIAVGMATNIPPHNLGELAEAVFWALDNYEADDEEATLAAMVER
VKGPDPFPTSGLIVGTQGIADAYKTGRGSIRMRGVVEVEEDSRGRTSLVITELPYQVNH
DNFITSIAEQVRDGKLAGISNIEDQSSDRVGLRIVIELKRDAVAKVVLNNLYKHTQLQ
TSFGANMLAIVDGVPRTLRLDQLIRHYVDHQLDVIIVRRTTYRLRKANERAHILRGLVK
ALDALDEVIALIRASETVDIARQGLIELLDIDEIQAQAILDMQLRRLAALERQRIIDD
LAKIEAEIADLEDILAKPERQRGIVRDELAIEIVEKHGDARRTRIVAADGDVSDEDIA
REDVXXXXXXXXXXXXXXXXXXLYRSQKRGGKGVQAGLQDDIVRHFFVCSTHDWILFF
TTQGRVYRAKAYELPEASRTARGQHVANLLAFQPEERIAQVIQIRSYEDAPYLVLATR
NGLVKKTKLTD FDSNRSGGIVAINLRDNDLVGAVLCSAEDDLLLSANGQSIRFSAT
DEALRPMGRATSGVQGMRFNADDYLLSLNVVREGTYLLVATSGGYAKRTAIEEYPVQG
RGGKGVLTVMYDRRRGRLVGALIVDEDESELYAITSGGGVIRTA"
```

ORIGIN

```
1 ggggtttccgc cccgaccgca gccacgccaa gtcggcgcgcg tcggtcgccg agacgatggg
61 caactaccac cccgaccgcg acgcctcgat ctacgacacc ctggtcgga tggccagcc
121 gtggtcgctg cgctaccgtg tggtcgacgg gcagggaac tttggtcgcg cgggcaacga
181 cccgcgcggc gcgatgcggt acaccgaggc gcggctgacc ccgctggcca tggagatgct
241 gcgcgaaatc gacgaggaga cagtcgattt cattcccaac tacgacggcc ggggtcaaga
301 gccgacggtg ctgcccagcc ggttcccaaa cctgctggcc aacgggtcgg ggggcatcgc
361 ggtcggcatg gccacgaaca tcccgcgcga caacctcggc gagctcgccg aggcggtgtt
421 ctgggcgctg gacaattacg aggcgcgca agaggccacc ctggccgccc tgatggaacg
481 ggtgaaaagg cccgacttcc cgacctcggg cctgatcgtc ggcacgcagg gcatcgccga
541 cgcctacaag accggccgcg gttccatccg gatgcgcgga gtcgttgagg tggagagga
601 ttcgcgcggc cgcacctcgc tggtcacac cgagttgccc tatcaggtca accacgaca
661 cttcatcacc tcgatcgccg agcaggtcgc cgacggcaag ctggccggca tctccaatat
721 cgaggaccaa tccagcgacc gggtcgggct gcgcacgctc atcgagctca agcgcgacgc
781 cgtcgccaag gtggtgctga acaacctcta caagcacacc cagctgcaga ccagcttcgg
841 cgccaacatg ctggccatcg tcgacggggt gccgcgcacc ctgcgcgctc accagctgat
901 ccgcactac gtcgaccacc aactcgacgt catcgctcgg cgcaccacct accggttcgc
961 caaggccaac gagcggggcc acatcctcgc cggctctggtc aaggcgctcg atgcgctcga
1021 cgaggtcatc gccctgatcc gggcgctcga aaccgtcgac atcgcgcgcc agggcttgat
1081 cgagctgctc gacatcgacg agatccaggc gcaggcgatc ctggacatgc agctgcgccg
1141 gctggccgcg ctggagcggc agcgcatcat cgacgacctg gccaaagatc aggcgagat
1201 cgccgacctg gaggacatcc tggccaagcc ggaacggcag cgcggcatcg tgcgcgacga
1261 gctcgccgag atcgctgaaa agcacggcga cgcgcggcgc acccggatcg tggccgcca
1321 cggcgacggt agcgacgagg atctgatcgc tcgcgaggac gtcnnnnnnn nnnnnnnnn
1381 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnna cctgtaccgc agccagaagc gcggcgccaa
1441 gggcgctcag ggcgcgcggc tcaaacagga cgacatcgtg cggcacttct tcgtgtgctc
1501 gacgcacgac tggatcctgt tcttcaccac ccaggggccg gtctaccgcg ccaaggccta
1561 cgaactgccc gaggcgtccc gcaccgcccg cggtcagcac gtggccaacc tgctggcggt
1621 ccagcccgag gagaggatcg ctcaggtgat ccagatccgg agctatgagg acgctcccta
1681 cctggtgctg gccaccgca acggcctggt gaagaagacc aagctgaccg acttcgactc
1741 gaaccgctcg ggcgccatcg tggcgatcaa cctgcgcgac aacgacgaac tcgtgggtgc
1801 ggtgttgtgc tcggccgagg acgatctgct gctggtgtcg gccaacggcc agtccatccg
1861 gttctcgcgc accgacgagg cgtgcgccc gatgggcccg gccacctccg gtgtgcaggg
1921 catgcgcttc aacgccgacg actacctgct gtcgctcaac gtggtccgcg agggcaccta
1981 cctgctggtg gcgacgtccg gcgggtacgc caagcgacc gcgatcgagg agtatccggt
2041 gcaggggcgc ggcggaagg cgtgctgac cgtgatgtat gaccgcccg gtggcaggct
2101 ggtgggtgct ctgattgtgg acgaggacag cgagctgtac gcgatcacct ccggcgggcg
2161 tgtcatccgc accgcggc
```

//

GenBank: EU029112.1

***Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I gyrase B (gyrB) gene, partial cds**

LOCUS EU029112 1626 bp DNA linear BCT 05-OCT-2007
 DEFINITION *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I gyrase B (gyrB) gene, partial cds.
 ACCESSION EU029112
 VERSION EU029112.1 GI:154795728
 KEYWORDS .
 SOURCE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
 ORGANISM *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
 Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; *Mycobacterium*; *Mycobacterium avium* complex (MAC).
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1626)
 AUTHORS Castellanos,E., Aranaz,A., Romero,B., de Juan,L., Alvarez,J., Bezos,J., Rodriguez,S., Stevenson,K., Mateos,A. and Dominguez,L.
 TITLE Polymorphisms in gyrA and gyrB genes among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III isolates
 JOURNAL J. Clin. Microbiol. 45 (10), 3439-3442 (2007)
 PUBMED 17670925
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1626)
 AUTHORS Castellanos,E., Aranaz,A., Romero,B., De Juan,L., Alvarez,J., Bezos,J., Rodriguez,S., Stevenson,K., Mateos,A. and Dominguez,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (10-JUL-2007) Animal Health, Complutense University of Madrid, Puerta De Hierro s/n, Madrid 28040, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1626
 /organism="Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /sub_species="paratuberculosis"
 /db_xref="taxon:1770"
 /PCR_primers="fwd_seq: aagaaggcgcaagacgaata, rev_seq: agcttcttgctccttggcgta"
 /PCR_primers="fwd_seq: gtacgccaaggacaagaagc, rev_seq: gtgggatccattgtggtttc"
 /note="type: I"
 gene <1..>1626
 /gene="gyrB"
 CDS <1..>1626
 /gene="gyrB"
 /codon_start=2
 /transl_table=11
 /product="gyrase B"
 /protein_id="ABS86852.1"
 /db_xref="GI:154795729"

```

/translation="EAVRKRP GMYIGSTGERGLHHLIWEVVDNSVDEAMAGYADRV DV
RILDDGSVEVADN GRGIPVAIHATGAPTVDV VMTQLHAGGKFGGENSGYNVSGGLHGV
GVSVVNALSTRLEVNIARDGYEWSQYYDHAVPGTLKQGEVTKRTGTTIRFWADPDIFE
TTEYDFETVARRLQEMAF LNKGLTINLTDERVTNEEVVDEVVSDTADAPKSAQEKA AE
SAAPHKVKHRTFHYPGG LVD FVKHINRTKNPIHQSIIDFGGKGPGHEVEIAMQWNGGY
SESVHTFANTINTHEGGT HXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXPQFEGQTKTKLG NTEVKS FVQKVCNEQLTHWFEANPADAKVIVNKAVSS
AQARIAARKARELVRRKSATDLGGLPGKLADCRSTDPRKSELYVVEGDSAGGSAKSGR
DSMFQAILPLRGKIINVEKARIDRV LKNTEVQAIITALGTGIHDEFDITKLRYHKIVL
MADADVDGQHISTLLLTLLFRFMRPLIEHGHVF"
gap 892..1028
/estimated_length=137
ORIGIN
1 ggaggcggtc cgcaaacgcc ccggcatgta catcggtccc accggcgagc gaggtctgca
61 ccacctcatc tgggaggtgg tcgacaactc ggtcgacgaa gcgatggccg gctacgccga
121 ccgggtcgac gtgcggatcc tggacgacgg cagcgttgag gtcgccgaca acggccgcgg
181 catcccgctc gcgattcacg cgaccggcgc cccaccgctc gacgtggtga tgacgcagct
241 gcacgccggc ggcaagtctg gcggcgaaaa cagcggctac aacgtcagcg gcggtctgca
301 cggcgctggc gtctcggtgg tcaacgcact gtccaccggc ctcgaggtca acatcgcccg
361 cgacggctac gagtggctgc agtactacga ccacgcctg cccggcacc tcaaacaggg
421 cgaggtcacc aagcgcaccg gcaccaccat ccggttctgg gccgaccccg acatcttca
481 gaccaccgag tacgacttcg aaacggtggc ccgacggctg caggaaatgg cgttcctca
541 caagggcctg accatcaacc tcaccgacga gcgggtgacc aacgaagagg tcgtcgacga
601 ggtggtcagc gacaccgccg acgcacccaa gtcggcgagc gagaaggcgg cggaatcggc
661 tgcgccgatc aaggtcaagc accgcacctt ccactacccc ggcggcctgg tcgacttcgt
721 caaacacatc aatcgacca aaaaccccat ccaccagagc atcatcgatt tcggtgggaa
781 gggcccgggc cagcaggtcg agatcgcatg gcagtggaac ggcggtctat ccgaatcggt
841 gcacacgttc gccaacacca tcaacacgca cgagggcggc acccacgagg a
[ gap 137 bp] Expand Ns
1029 aa ccgcagttcg agggccagac caagaccaa ctgggcaaca ccgaggtgaa
1081 gtcgttcgtg cagaaggtgt gcaacgaaca gtcacccac tggttcgaag ccaaccccg
1141 agacgcaaaa gtcattgtca acaaggcggc ttcgtcagcg caggcgcgca ttgccgcgg
1201 caaggcgcca gattggtgac gccgcaagag cgcaaccgac ctgggcgggc tgcccggca
1261 gtcgccgac tgccggtcga ccgaccggc caagtcggaa ttgtatgtgg tcgaggtga
1321 ctcgccggc ggctcggcga aaagcgccg ggactcgatg ttccaggcca tccttcgct
1381 gcgcggcaag atcatcaacg tcgaaaaggc ccgcatcgac cgggttttga agaaccgca
1441 agtgcaggcg atcatcaccg cgctgggcac cgggattcac gacgagttcg acatcacca
1501 gctgcgctac cacaagatcg tgttgatggc cgacggcgac gtggacggcc agcacatctc
1561 gacgctgttg ttgacgtgc tgttcgggt catgcggccg ctgatcgaac acgggcacgt
1621 gttctt
//

```

GenBank: EU029114.1

***Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type III gyrase B (gyrB) gene, partial cds**

LOCUS EU029114 1628 bp DNA linear BCT 05-OCT-2007
 DEFINITION *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type III gyrase B (gyrB) gene, partial cds.
 ACCESSION EU029114
 VERSION EU029114.1 GI:154795732
 KEYWORDS .
 SOURCE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
 ORGANISM *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; *Mycobacterium*; *Mycobacterium avium* complex (MAC).
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1628)
 AUTHORS Castellanos,E., Aranaz,A., Romero,B., de Juan,L., Alvarez,J., Bezos,J., Rodriguez,S., Stevenson,K., Mateos,A. and Dominguez,L.
 TITLE Polymorphisms in gyrA and gyrB genes among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III isolates
 JOURNAL J. Clin. Microbiol. 45 (10), 3439-3442 (2007)
 PUBMED 17670925
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1628)
 AUTHORS Castellanos,E., Aranaz,A., Romero,B., De Juan,L., Alvarez,J., Bezos,J., Rodriguez,S., Stevenson,K., Mateos,A. and Dominguez,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (10-JUL-2007) Animal Health, Complutense University of Madrid, Puerta De Hierro s/n, Madrid 28040, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1628
 /organism="Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /sub_species="paratuberculosis"
 /db_xref="taxon:1770"
 /PCR_primers="fwd_seq: aagaaggcgcaagacgaata, rev_seq: agcttcttgctccttggcgta"
 /PCR_primers="fwd_seq: gtacgccaaggacaagaagc, rev_seq: gtgggatccattgtggttcc"
 /note="type: III"
 gene <1..>1628
 /gene="gyrB"
 CDS <1..>1628
 /gene="gyrB"
 /codon_start=2
 /transl_table=11
 /product="gyrase B"
 /protein_id="ABS86854.1"
 /db_xref="GI:154795733"

/translation="EAVRKRP GMYIGSTGERGLHHLIWEVVDNSVDEAMAGYADRV DV

RILDDGSVEVADNGRGI PVAIHATGAPTVDVMTQLHAGGKFGGENSGYNVSGGLHGV
 GVSVVNALSTRLEVNIARDGYEWSQYYDHAVPGTLKQGEVTKRTGTTIRFWADPDIFE
 TTEYDFETVARRLQEMAFLNKGLTINLTDERVTNEEVVDEVVSDTADAPKSAQEKAEE
 SAAPHKVKHRTFHYPGGLVDFVKHINRTKNPIHQSIIDFGGKGPGEVEIAMQWNGGY
 SESVHTFANTINTHEGGTHEXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXREGLA
 AVISVKVSEPPQFEGQTKTKLGNTTEVKS FVQKVCNEQLTHWFEANPADAKVIVNKAVSS
 AQARIAARKARELVRRKSATDLGGLPGKLADCRSTDPRKSELYVVEGDSAGGSAKSGR
 DSMFQAILPLRGKIINVEKARIDRVLKNTEVQAIITALGTGIHDEFDITKLRYHKIVL
 MADADVDGQHISTLLLLTLLFRFMRPLIEHGHVFL"

ORIGIN

```

1  ggaggcggtc  cgaaaacgcc  ccggcatgta  catcggtccc  accggcgagc  gaggtctgca
61  ccacctcatc  tgggaggtgg  tgcacaactc  ggtcgacgaa  gcgatggccg  gctacgccga
121  ccgggtcgac  gtgcggatcc  tggacgacgg  cagcgttgag  gtcgccgaca  acggcccgcg
181  catccccgtc  gcgattcacg  cgaccggcgc  cccaccgtc  gacgtggtga  tgacgcagct
241  gcacgccggc  ggcaagtctg  gcggcgaaaa  cagcggctac  aacgtcagcg  gcggtctgca
301  cggcgctcgg  gtctcggtag  tcaacgcact  gtccaccggc  ctcgaggtca  acatcgcccg
361  cgacggctac  gagtggctgc  agtactacga  ccacgccgtg  cccggcaccc  tcaaacaggg
421  cgaggtcacc  aagcgcaccg  gcaccaccat  ccggttcttg  gccgaccocg  acatcttcga
481  gaccaccgag  tacgacttcg  aaacggtggc  ccgacggctg  caggaaatgg  cgttctcaa
541  caagggcctg  accatcaacc  tcaccgacga  gcgggtgacc  aacgaagagg  tcgtcgacga
601  ggtggtcagc  gacaccgccg  acgcacccaa  gtcggcgag  gagaaggcgg  cggaatcggc
661  tgcgccgcat  aaggtcaagc  accgcacctt  ccactacccc  ggcggcctgg  tcgacttcgt
721  caaacacatc  aatcgcacca  aaaaccccat  ccaccagagc  atcatcgatt  tcggtgggaa
781  gggccccggc  cagcaggtcg  agatcgcgat  gcagtggaa  ggcggtctat  ccgaatcggt
841  gcacacgttc  gccaacacca  tcaacacgca  cgagggcggc  acccaccagg  annnnnnnnn
901  nnnnnnnnnn  nnnnnnnnnn  nnnnnnnnnn  nnnnnnnnnn  nnnnnnnnnn  nnnnnnnnnn
961  nnnnnnnnnn  nnnnnnnnnn  nnnnnntccg  cgagggtttg  gccgcggtga  tctcggtcaa
1021  ggtgagcgaa  ccgcagttcg  agggccagac  caagaccaa  ctgggcaaca  ccgaggtgaa
1081  gtcgttcgtg  cagaaggtgt  gcaacgaaca  gtcacccac  tggttcgaag  ccaacccgc
1141  agacgcaaaa  gtcattgtca  acaaggcggg  ttcgtcagcg  caggcgcgca  ttgccgcgcg
1201  caaggcgcg  gagttggtgc  gccgcaagag  cgcaaccgac  ctgggcgggc  tgcccgcaa
1261  gtcgccgac  tgccggtcga  ccgaccgcg  caagtcggaa  ttgtatgtgg  tcgaggtgga
1321  ctcgccggc  ggctcggcga  aaagcgccg  ggactcgatg  ttccaggcca  tccttcggct
1381  gcgcggcaag  atcatcaacg  tcgaaaaggc  ccgcacgcac  cgggttttga  agaacaccga
1441  agtgcaggcg  atcatcaccg  cgctgggcac  cgggattcac  gacgagttcg  acatcaccaa
1501  gctgcgctac  cacaagatcg  tgttgatggc  cgacgccgac  gtggacggcc  agcacatttc
1561  gacgctgtt  ttgacgctgc  tgttcgggt  catgcggccg  ctgatcgaac  acgggcacgt
1621  gttcttgg
    
```

GenBank: FJ775181.1

***Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* clone 21P
insertion sequence IS900, partial sequence**

LOCUS FJ775181 653 bp DNA linear BCT 06-JUL-2009
 DEFINITION *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* clone 21P insertion
 sequence IS900, partial sequence.
 ACCESSION FJ775181
 VERSION FJ775181.1 GI:224994940
 KEYWORDS .
 SOURCE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
 ORGANISM *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
 Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium; Mycobacterium
avium complex (MAC).
 REFERENCE 1 (bases 1 to 653)
 AUTHORS Castellanos,E., Aranaz,A., de Juan,L., Alvarez,J., Rodriguez,S.,
 Romero,B., Bezos,J., Stevenson,K., Mateos,A. and Dominguez,L.
 TITLE Single nucleotide polymorphisms in the IS900 sequence of
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* are strain type
 specific
 JOURNAL J. Clin. Microbiol. 47 (7), 2260-2264 (2009)
 PUBMED 19439536
 REFERENCE 2 (bases 1 to 653)
 AUTHORS Castellanos,E., de Juan,L., Alvarez,J., Rodriguez,S., Romero,B.,
 Bezos,J., Stevenson,K., Mateos,A., Dominguez,L. and Aranaz,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (18-FEB-2009) Animal Health, Animal Health Surveillance
 Center (VISA-VET), Veterinary Faculty, Complutense University of
 Madrid, Avda. Puerta de Hierro S/N, Madrid 28040, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..653
 /organism="Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /host="Ovis aries"
 /sub_species="paratuberculosis"
 /db_xref="taxon:1770"
 /clone="21P"
 /note="type: I"
 repeat_region <1..>653
 /note="conserved region"
 /mobile_element="insertion sequence:IS900"
 ORIGIN
 1 gtgttcgggg cgcgcggcct taggcttcga attgcccgag gacgtcgggt atggctttca
 61 tgtggttgct gtgttgatg gccgaaggag attggccgcc cggcgctccg cgacgactcg
 121 accgctaatt gagagatgag attggatcgc tgtgtaagga cagtcggcg tggtcgtctg
 181 ctgggttgat ctggacgat acggttacgg aggtggttgt ggcacaacct gtctgggcgg
 241 gcgtggacgc cggtaaggcc gaccattact gcatggttat taacgacgac gcgcagcgat
 301 tgctctcgca gcgggtggcc aacgacgagg ccgcgctgct ggagttgatt gcggcggtga
 361 cgacgttggc cgatggagg gaggtcacgt gggcgatcga cctcaacgcc ggccgcccgc
 421 cggttgctgat cgccttgctc atcgctgccg ggcagcggct gctttatatt cccgggcgca
 481 cgggccatca cgccgcgggt agttaccgcg gcgaaggcaa gaccgacgcc aaagacgctg
 541 cgatcatcgc cgatcaggcc cggatgcgcc acgacttgca gcctctgcgc gccggcgatg
 601 acatcgagct cgagctgcgc atcctgacca gccgacgttc cgattctggt gga
 //

GenBank: FJ775182.1

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis clone CAM 86 insertion sequence IS900, partial sequence

LOCUS FJ775182 623 bp DNA linear BCT 06-JUL-2009
 DEFINITION *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* clone CAM 86 insertion sequence IS900, partial sequence.
 ACCESSION FJ775182
 VERSION FJ775182.1 GI:224994941
 KEYWORDS .
 SOURCE *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*
 ORGANISM *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium; Mycobacterium avium complex (MAC).
 REFERENCE 1 (bases 1 to 623)
 AUTHORS Castellanos,E., Aranaz,A., de Juan,L., Alvarez,J., Rodriguez,S., Romero,B., Bezos,J., Stevenson,K., Mateos,A. and Dominguez,L.
 TITLE Single nucleotide polymorphisms in the IS900 sequence of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* are strain type specific
 JOURNAL J. Clin. Microbiol. 47 (7), 2260-2264 (2009)
 PUBMED 19439536
 REFERENCE 2 (bases 1 to 623)
 AUTHORS Castellanos,E., de Juan,L., Alvarez,J., Rodriguez,S., Romero,B., Bezos,J., Stevenson,K., Mateos,A., Dominguez,L. and Aranaz,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (18-FEB-2009) Animal Health, Animal Health Surveillance Center (VISAVET), Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Avda. Puerta de Hierro S/N, Madrid 28040, Spain
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..623
 /organism="Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /host="Capra aegagrus hircus"
 /sub_species="paratuberculosis"
 /db_xref="taxon:1770"
 /clone="CAM 86"
 /note="type: III"
 repeat_region <1..>623
 /note="conserved region"
 /mobile_element="insertion sequence:IS900"
 ORIGIN
 1 ggggccgtcg gccttaggct tcgaattgcc cagggacgtc gggatatggct ttcattgtggt
 61 tgctgtgttg gatggccgaa ggagattggc cgcccgcgct cccgcgacga ctcgaccgct
 121 aattgagaga tgcgattgga tcgytgtgta aggacacgct ggcgtggctg tctgctgggt
 181 tgatctggac ratgacggtt acggaggttg ttgtggcaca acctgtctgg gcgggcgtgg
 241 acgccggtaa ggccgaccat tactgcatgg ttattaacga cgacgcgcag cgattgctct
 301 cgcagcgggt ggccaacgac gaggccgcgc tgctggagtt gattcgcgcg gtgacgacgt
 361 tggccgatgg aggcgaggtc acgtgggcga tcgacctcaa cgccggcggc gccgcgttgc
 421 tgatcgccct gctcatcgct gccgggcagc ggctgcttta tattcccggg cgcacgggtcc
 481 atcacgccgc gggtagttac cgcggcgaag gcaagaccga cgccaaagac gctgcgatca
 541 tcgccgatca ggcccgatg gccacgact tgcagcctct gcgcgccggc gatgacatcg
 601 cagtcgagct gcgcacacct acc
 //